Düsseldorf 1975

HABILITATIONSSCHRIFT

IMMUNREAKTIONEN UND IMMUNTOLERANZ GEGENÜBER INSULIN IM TIERVERSUCH

Dr. med. FRANZ KLAUS JANSEN

APRIL 1975

Aus der Klinischen Abteilung des Diabetes-Forschungs-
institutes an der Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. F.A. Gries)

IMMUNREAKTIONEN UND IMMUNTOLERANZ GEGENÜBER INSULIN IM TIERVERSUCH

Habilitationsschrift

der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt

von

Dr. med. Franz Klaus Jansen

April 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A E I N F Ü H R U N G

A I. IMMUNOLOGISCHE NEBENWIRKUNGEN 1

A II. IMMUNSYSTEM UND ANTIGEN 1

A III. FORMEN DER IMMUNREAKTION 3

a) Humorale Immunreaktion 3

b) Zelluläre Immunreaktion 3

c) Autoimmunreaktion 4

B L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T 5

B I. IMMUNOLOGISCHE KOMPLIKATIONEN DER INSULINTHERAPIE

a) Insulinallergie 5

1. Pathogenese 5
2. Formen der Insulinallergie 6
3. Bedeutung der Insulinallergien 7

b) Insulinresistenz

1. Pathogenese 8
2. Bedeutung der Insulinresistenz 10

B II. EXPERIMENTELLE IMMUNREAKTIONEN GEGENÜBER INSULIN

a) Insulinantikörper 12

1. Allergie-Antikörper und neutralisierende Antikörper 12
2. Insulinantikörper-Nachweismethoden 13
3. Antikörperklassen 14
4. Spezifität der Insulinantikörper 15

b) Insulitis 15

1. Befunde bei Diabetikern 15
2. Virushypothese 16
3. Immunologische Hypothesen 17

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543915_0112

c) Immunologisch erzeugte diabetische Symptome

1. Hyperglykämie und pathologische Glucosetoleranz 18

2. Diabetische Gefäßschäden 19

B III. MÖGLICHKEITEN EINER IMMUNTOLERANZ GEGENÜBER INSULIN

a) Formen der Immuntoleranz 20

1. Embryonaltoleranz 20

2. Erwachsenentoleranz 21

3. Immunsuppressionstoleranz 22

4. Antikörpertoleranz 22

b) Eigenschaften der Immuntoleranz

1. Dauer der Toleranz 23

2. Spezifität der Toleranz 23

3. Grundlagen der Toleranz 23

c) Einfluß des Antigens auf die Toleranz

1. Toleroimmunogenität 24

2. Kreuzreaktion mit anderen Antigenen 24

C E I G E N E F R A G E S T E L L U N G 26

C I. IMMUNOLOGISCHE TOLERANZ UND ANTIKÖRPER-BILDUNG NACH IMMUNISATION MIT UNREINEM INSULIN 27

C II. IMMUNOLOGISCHE TOLERANZ UND ANTIKÖRPER-BILDUNG NACH IMMUNISATION MIT HOCHGE-REINIGTEM INSULIN 29

C III. EINFLUß DER IMMUNTOLERANZ UND DER REINHEIT DES INSULINS AUF DIE INSULITIS 31

C IV. EINFLUß DER IMMUNTOLERANZ UND DER REINHEIT DES INSULINS AUF DIE GLUCOSETOLERANZ 32

D E I G E N E V E R S U C H E 34

D I. VERSUCHSANSATZ

a) Immunisationsperiode 34

b) Testimmunisation 36

D II. MATERIAL UND METHODEN 39

a) Insulin 39

b) Versuchstiere 41

c) Immunisation 41

d) Antikörperbestimmung 43

e) Isoimmundiagramm-Berechnung 48

f) Histologische Untersuchung 50

g) Glucosetoleranztest 51

h) Statistische Berechnungen 51

D III. ERGEBNISSE 52

a) Immunantwort verschiedener Mäusestämme 52

b) Testimmunisation nach Vorbehandlung mit 1 mal krist. Insulin 53

1. Kontrollen 53

2. Experimentalgruppen (Einzelseren) 55

3. Experimentalgruppen (Mischseren) 58

4. Isoimmundiagramm für 1 x krist. Insulin 60

c) Testimmunisation nach Vorbehandlung mit MC-Insulin 65

1. Experimentalgruppen (Einzelwerte) 65

2. Experimentalgruppen (Mischseren) 68

3. Isoimmundiagramm für MC-Insulin 70

d) Vergleich beider Insulinchargen nach der Testimmunisation 74

e) Vergleich beider Insulinchargen während der Immunisationsperiode ohne Adjuvans 74

f) Entstehen von Insulitis 77
1. Histologie 77
2. Verteilung auf Insulinchargen und -dosen 77
3. Beziehung zu Insulinantikörpern 80

g) Entstehen von Periduktulitis 82
1. Histologie 82
2. Verteilung auf Insulinchargen und -dosen 82
3. Beziehung zu Insulinantikörpern 84

h) Entstehen pathologischer Glucosetoleranz-werte 87
1. Normalwerte 87
2. Verteilung auf Insulinchargen und -dosen 87
3. Beziehung zu Insulinantikörpern 92

D IV. DISKUSSION 96

a) 1 mal kristallisiertes Insulin
1. Immunogenität 96
2. Tolerogenität 97
3. Immunmodell für 1 mal krist. Insulin 99
4. Beurteilung der Versuchstiere 103

b) MC-Insulin 104
1. Immunogenität 104
2. Bedeutung des Molekulargewichts 106
3. Klinische Bedeutung 107
4. Tolerogenität und Immunmodell für MC-Insulin 109

c) Insulitis 111
1. Einfluß der Insulincharge 113
2. Bedeutung der Insulinantikörper 115

d) Periduktulitis 116
1. Einfluß der Insulincharge 117
2. Bedeutung der Insulinantikörper 117

e) Glucosetoleranz 118
1. Einfluß der Insulincharge 118
2. Bedeutung der Insulinantikörper 119
3. Hypothesen über vermutliche Faktoren 119
4. Hinweise aus der Literatur 121

f) Zukunftsperspektiven 124
I. Strukturell "fremde" Insuline 124
II. Insulinresistenz 125
III. Immundiabetes 126
IV. Die immunologische Toleranz 126

E Z U S A M M E N F A S S U N G 128

F L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

A

E I N F Ü H R U N G

I IMMUNOLOGISCHE NEBENWIRKUNGEN

Immunologische Nebenwirkungen eines Arzneimittels können die Therapie beeinträchtigen. Die durch ein Arzneimittel ausgelösten immunologischen Komplikationen sind häufig harmlos, können aber auch zu sehr ernsthaften Folgen mit letalem Ausgang führen. Dramatisch verlaufen anaphylaktische Schockreaktionen, die besonders häufig bei der Penizillinallergie zum Tode geführt haben (IDSOE et al. 1968). Auch nach einer Insulintherapie sind einzelne anaphylaktische Schockreaktionen mit letalem Ausgang beobachtet worden (HANSEN 1957, MILLER 1962). Eine wesentlich häufigere Komplikation stellt die immunologische Insulinresistenz dar, bei der das therapeutisch zugeführte Insulin durch Immunprozesse in seiner Wirksamkeit herabgesetzt wird, so daß immer höhere Insulindosen benötigt werden. Manchmal können auch heute noch solche Patienten der Therapie entgleiten und in einem therapieresistenten Coma diabeticum sterben. Lokale und generalisierte Allergien stören ebenfalls bei der Insulintherapie. Ein so spezifisches Therapeuticum wie Insulin wird daher selbst 50 Jahre nach seiner Einführung in die Therapie immer noch nicht dem wichtigsten medizinischen Leitsatz gerecht:

PRIMUM NIL NOCERE.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Immunreaktionen gegenüber Insulin im Tierversuch mit dem Ziel, Hinweise zu erhalten, wie immunologische Nebenwirkungen u.a. durch eine immunologische Toleranz zu verhindern seien.

II IMMUNSYSTEM UND ANTIGEN

Eine wesentliche Aufgabe des Immunsystems besteht darin, alle in den Organismus eindringenden Fremdstoffe zu beseitigen. Diese Funktion hat ihren hauptsächlichen Wert in der Abwehr von schädigenden Fremdstoffen, wie Giften, Viren und Bakterien. Sie vermag

aber nutzbringende Fremdstoffe, wie fremdes Serum oder artfremde Hormone hiervon nicht zu unterscheiden und zu tolerieren. Die auf dem blinden Prinzip der Intoleranz von Fremdstoffen aufgebaute immunologische Abwehr ist den natürlichen Lebensbedingungen der Organismen trotzdem sehr gut angepaßt, da im allgemeinen nutzbringende Stoffe nicht spontan in einen Organismus eindringen. Dieses blinde Prinzip stört dagegen bei künstlichem Eingreifen in den Organismus aus therapeutischen Gründen.

Das Immunsystem erkennt einen Fremdstoff aufgrund seiner andersartigen Raumstruktur - Tertiärstruktur -, die bei Proteinen durch die Sequenz der Aminosäuren - Primärstruktur - vorgegeben ist. Bei der Insulintherapie der Diabetiker wird das Immunsystem mit einem Fremdstoff, dem aus Tierpankreas gewonnenen Insulin konfrontiert. Die tägliche parenterale Applikation eines speziesverschiedenen Insulins über Jahre und Jahrzehnte stellt daher eine Dauerstimulation des Immunsystems mit einem körperfremden Stoff dar, wie sie in gleicher Intensität im Tierversuch nur schwer nachgeahmt werden kann. Immunologische Abwehrreaktionen gegen artfremdes Insulin müssen daher bei der Insulintherapie erwartet werden. Es ist eher erstaunlich, daß sie nicht häufiger und intensiver auftreten.

Die Fähigkeit einer Fremdsubstanz - Antigen - eine immunologische Abwehrreaktion zu erzeugen, wird Immunogenität genannt. Sie hängt u.a. vom Molekulargewicht des Antigens und von dem Grad seiner Verschiedenheit gegenüber den entsprechenden körpereigenen Substanzen ab (HUMPHREY und WHITE 1964). Aufgrund beider Kriterien ist Insulin ein schwaches Immunogen und führt nur wegen der intensiven Dauerstimulation des Immunsystems zu Abwehrreaktionen.

III FORMEN DER IMMUNREAKTION

Die Abwehrreaktionen erfolgen entweder durch Bildung von spezifisch gegen Insulin gerichteten Antikörpern, die humorale Immunreaktion, oder durch spezifisch gegenüber Insulin sensibilisierte Lymphozyten, die zelluläre Immunreaktion. Bei Autoimmunreaktionen gegenüber Insulin können sowohl Antikörper als auch sensibilisierte Lymphozyten festgestellt werden.

a) Humorale Immunreaktionen

Zu den auf Antikörpern gegen heterologes Insulin beruhenden Immunreaktionen wird die Insulinresistenz gezählt. Sie ist eine Erhöhung des täglichen Insulinbedarfs auf über 200 E nach manchen Autoren (MARTIN et al. 1941, DAWEKE 1966) oder auf über 100 E nach anderen Autoren (FEDERLIN et al. 1971). Von den allergischen Hautreaktionen werden die Sofortreaktionen ebenfalls durch Antikörper bewirkt. Wenn es gelänge, die Antikörperproduktion zu unterbinden, müßten diese immunologischen Nebenwirkungen des Insulin verschwinden. Hierzu gibt es in der Literatur zwei Ansätze:

1) Hochreinigung des kristallinen Insulins von seinen Verunreinigungen (SCHLICHTKRULL et al. 1969)
2) Erzeugung einer immunologischen Toleranz gegenüber Insulin (KERP et al. 1969, MOLONEY und TIRPAK 1969)

Beide Ansätze werden in dieser Arbeit experimentell verfolgt und teilweise weiter ausgebaut.

b) Zelluläre Immunreaktion

Die allergischen Hautreaktionen vom Spättyp werden der zellulären Abwehr des Immunsystems zugerechnet (FEDERLIN 1971). Möglicherweise gehören auch die bei jugendlichen Diabetikern mit kurzem

Krankheitsverlauf gefundenen zellulären Infiltrationen der Inseln des Pankreas, nach von MEYENBURG (1940) Insulitis genannt, zu zellulären Immunreaktionen gegenüber Insulin. Experimentell kann die Insulitis bei verschiedenen Spezies durch Immunisation mit Insulin erzeugt werden. In dieser Arbeit wurde sie auch bei der Maus hervorgerufen. Entsprechend den oben beschriebenen Ansätzen, der Hochreinigung und der Toleranz, sollte es auch möglich sein, die Ausbildung einer Insulitis zu verhindern. Diese Arbeit enthält einige Hinweise darauf.

c) Autoimmunreaktion

Der Diabetes tritt statistisch gesehen häufiger mit Autoimmunerkrankungen zusammen auf, z.B. mit einer Thyreoiditis,einer Perniziosa oder einem Morbus Addison. Daher entsteht die wichtige Frage, ob der Diabetes nicht selbst auch eine Autoimmunerkrankung sei. Man kann im Tier durch Immunisation mit Insulin zwar einen Immundiabetes erzeugen, es bleibt jedoch die Frage, wie weit dieser Modell-Diabetes mit dem menschlichen Diabetes vergleichbar wäre. Hierzu soll in dieser Arbeit aufgrund eigener Befunde Stellung genommen werden.

B LITERATURÜBERSICHT

Nach der Entdeckung des Insulins (BANTING und BEST 1922) standen zunächst die klinisch-immunologischen Komplikationen bei der Insulintherapie im Vordergrund. Man entdeckte schon bei seiner ersten Anwendung allergische Reaktionen (JOSLIN et al. 1922) und einige Zeit später das Phänomen der Insulinresistenz (FALTA 1924 u.a.), welches aber erst durch LOWELL (1944) als Immunreaktion gegenüber exogenem Insulin gedeutet wurde. Das tierexperimentelle Studium immunologischer Reaktionen wurde erst relativ spät aufgenommen und diente im Anfang hauptsächlich der Deutung klinisch-immunologischer Erscheinungen (WASSERMAN et al. 1940, LOWELL und FRANKLIN 1949).

I IMMUNOLOGISCHE KOMPLIKATIONEN DER INSULINTHERAPIE

a) Insulinallergie

1. Pathogenese

Die bei der ersten Anwendung der Insulintherapie im Jahre 1922 bei 5 % der Patienten gefundene Urticaria (JOSLIN et al. 1922) ließ sich auf kontaminierende aus Tierpankreas stammende Proteine zurückführen, da die ersten Extraktionsverfahren noch nicht zu einem hohen Reinheitsgrad des Insulins führten. Eine entscheidende erste Verbesserung gelang ABEL (1926) mit der Kristallisation des Insulins, die es ermöglichte, Insulin weitgehend von fremden Proteinen zu reinigen. Die schweren Insulinallergien wurden wesentlich seltener, so daß JORPES (1949) bereits glaubte, daß mehrfach kristallisiertes Insulin keine Allergien mehr hervorrufen könnte. Aber auch später, als nur mehrfach kristallisiertes Insulin im Handel war, wurden immer noch Insulinallergien beobachtet. Besondere Bedeutung hatten dabei auch die Depotformen des Insulins, wie Protamininsulin und Globininsulin, da sie eher zu Hautreaktionen führten als Altinsuline (MARBLE 1959).

Möglicherweise diente die Depotform als Adjuvans oder aber erzeugte selbst eine Allergie (z.B. Surfenallergie DAWEKE 1968). Aber auch kontaminierende Proteine wurden in mehrfach kristallisiertem Insulin nachgewiesen (HARFENIST und CRAIG 1952, MIRSKY und KAWAMURA 1966, STEINER et al. 1968). Daß solche geringen Beimengungen Antikörper erzeugen konnten, bewiesen LAPRESLE und GRABAR (1957). Eine weitere Verbesserung der Insulindarstellung wurde von SCHLICHTKRULL et al. (1969) eingeführt. Er reinigte kristallines Insulin durch Gel- und Ionenaustauscherchromatographie weitgehend von allen kontaminierenden Proteinen, die nicht dem wahren Sangerinsulin entsprachen. Das daraus entstandene hochgereinigte Insulin "Monokomponent-Insulin" (MC-Insulin) wurde wie auch ähnliche Präparationen anderer Firmen in die Therapie eingeführt. Leider sind zur Zeit noch keine abschließenden klinischen Erfahrungen über Allergien an einem größeren Untersuchungsgut zugänglich. Daher kann die Frage noch nicht beantwortet werden, ob die Allergien bei der Insulintherapie auf Unreinheiten des Insulins oder doch auf das reine Hormon, d.h. das wahre Sangerinsulin (jenes Insulin, das der Sangerschen Formel entspricht) zurückzuführen sind (FEDERLIN et al. 1971).

2. Formen der Insulinallergie

COOMBS und GELL (1968) teilten die Allergien in folgende 4 Kategorien ein:

I. Reaktion vom Soforttyp, anaphylaktische Reaktion,

II. zytolytische oder zytotoxische Reaktion,

III. Arthusphänomen oder toxisches Komplexsyndrom,

IV. Reaktion vom Spättyp.

Die beiden wichtigsten Formen bei der Insulinallergie sind die Sofortreaktion (I) und die Spätreaktion (IV); die erstere verläuft nach einem sekundären Antigenkontakt in Stunden, die

letztere in Tagen. Bei der Spätreaktion (IV) entsteht 18 - 24 Stunden nach der erneuten Insulininjektion eine Rötung und Schwellung der Haut mit juckenden, stechenden Schmerzen. Nach 2 Tagen hat die Reaktion ihren Höhepunkt erreicht und klingt in den folgenden Tagen wieder vollständig ab. Bei der Sofortreaktion (I) entsteht ein fleckiges Erythem mit Quaddelbildung 1/2-2 Stunden nach subkutaner Injektion, bzw. 10 - 15 Minuten nach intrakutaner Applikation (FEDERLIN 1971). In Anlehnung an DEVLIN (1968) bezeichnen FEDERLIN et al. (1971) allergische Reaktionen, die zeitlich zwischen der Sofort- und der Spätreaktion, d.h. etwa 3 - 4 Stunden nach der Antigenapplikation erfolgen, als verzögerte Sofortreaktionen. Das Arthusphänomen (III) welches etwa zur gleichen Zeit einzuordnen wäre, führt zu Hautnekrosen, wurde aber nach Insulin nur selten beobachtet (BARTELHEIMER 1952, KULPE 1958). Alle Allergieformen benötigen zwischen dem Erstkontakt mit dem Antigen und ihrem ersten Auftreten eine verschieden lange Latenzzeit. Bei der Spätreaktion dauert diese 6 - 10 Tage nach dem Erstkontakt mit dem Antigen, daher tritt diese Form im allgemeinen zu Beginn einer Insulintherapie auf. Bei der Sofortreaktion ist die Latenzzeit wesentlich länger. Es können bis zu ihrem ersten Auftreten Jahre vergehen (SHIPP 1965), so daß diese Form eher im Verlaufe einer Insulintherapie entsteht.

3. Bedeutung der Insulinallergien

Angaben über die Häufigkeit der Insulinallergien sind großen Schwankungen unterworfen. Nach MARBLE (1959) wurden sie in der Joslinklinik bei 25 - 33 % beobachtet. Jedoch hängen Häufigkeitsangaben sehr davon ab, ob speziell nach allergischen Symptomen gefahndet wurde. Bei systematischer Befragung fanden auch FEDERLIN et al. (1971) Allergien bei 40 %, während sie vorher nur von 4 - 5 % der insulinbehandelten Patienten spontan angegeben wurden. Für diesen großen Unterschied sind hauptsächlich die Spätreaktionen

verantwortlich, da sie nur am Anfang der Therapie auftreten und zumeist von selbst wieder verschwinden. Dagegen werden Sofortreaktionen eher spontan angegeben (FEDERLIN et al. 1971). Besondere klinische Bedeutung haben neben den lokalisierten Sofortreaktionen vor allem die generalisierten Erscheinungen mit fleckigem Erythem über dem ganzen Körper oder mit Urticaria, Pruritus, Gelenkschwellungen und Fieber, die bei 0,1 - 0,4 % der insulinbehandelten Diabetiker vorkommen (ANDREANI und CORTI 1955, DEVLIN 1968, FEDERLIN et al. 1971). In seltenen Fällen kommt es zu anaphylaktischen Schocks (ROSE und BARRON 1955, HANAUER und BATSON 1961), die so schwer sein können, daß sie ad exitum führen, wie dies in Einzelfällen von HANSEN (1957) und von MILLER (1962) beschrieben wurde.

Bei behandlungsbedürftigen Allergien kann therapeutisch versucht werden, den Patienten auf ein anderes, besser verträgliches Insulin umzustellen. Dies spricht dafür, daß nicht immer das reine Sangerinsulin allein, sondern auch Begleitstoffe mitverantwortlich sind. Bei Versagen anderer Insulinchargen kann auch nach Gewichtsreduktion versucht werden, auf orale Antidiabetica umzustellen (FEDERLIN 1971) oder eine Desensibilisierung vorzunehmen (STROHFELD 1969).

b) Insulinresistenz

1. Pathogenese

Im Verlaufe einer Insulinbehandlung steigt bei manchen Diabetikern die täglich notwendige Insulindosis immer weiter an, so daß langsam eine Resistenz gegenüber Insulin entsteht, bei der auch extrem hohe Dosen kaum noch wirksam sind (FALTA 1924, MAHLER und PASTERNY 1924, JACKSCHWARTENHORST 1925). Der stark wechselnde tägliche Insulinbedarf bereitete therapeutische Probleme bei der Einstellung des Diabetes. OBERDISSE (1948) beobachtete einen phasenhaften Verlauf der Insulinresistenz mit schwankendem Insulinbedarf und

Neigung zu unerwarteten spontanen Hypoglykämien. DITSCHUNEIT und FEDERLIN (1966) berichteten über häufige nächtliche Hypoglykämien trotz fortlaufender Nahrungszufuhr. Bei einem Fall von MARTIN et al. (1941) mit einer sehr schweren Insulinresistenz stieg der Insulinbedarf innerhalb von 14 Tagen von 25E auf 1 200 E an, fiel auf 205 E zurück, um wieder erneut 1 200 E zu erreichen. Selbst nach den höchsten Insulingaben schwankte der Blutzucker im Tagesprofil zwischen 250 und 500 mg%. Die Patientin verstarb im insulinresistenten Coma diabeticum mit einem Blutzuckerwert von 500 mg%. Der Insulinbedarf kann extreme Formen annehmen, z.B. 40 000 E/Tag (ungefähr 1,5 g/Tag) und wird trotzdem praktisch nur durch die Nahrungsaufnahme gesteuert (PFEIFFER 1966). TUCKER et al. 1964 berichteten sogar über einen noch höheren Insulinbedarf von 177 580 E/Tag (ungefähr 6,5 g/Tag). Die schwere Insulinresistenz führte früher häufiger zum insulinresistenten Coma diabeticum, in welchem die Patienten verloren wurden (THANNHAUSER 1933, ENGEL 1934, WIENER 1938). Aber auch heute gibt es noch Einzelfälle, die nicht gerettet werden können (PFEIFFER 1966).

Man unterteilte die Insulinresistenz in passagere und chronische Formen (OBERDISSE 1948, DAWEKE 1966). Die passageren Formen entstanden entweder durch schlechte Einstellung, Überproduktion kontrainsulärer Hormone, zirkulierende Inhibitoren oder Infekte (DAWEKE 1966, FEDERLIN et al. 1971). Die chronische Form wurde durch LOWELL (1944) auf das Vorhandensein von gegen Insulin gerichteten Antikörpern zurückgeführt. Die Einführung hochsensibler Nachweismethoden für Insulinantikörper, wie die passive Hämolysemethode nach ARQUILLA und STAVITZKY (1956a, b) und vor allem die Radioimmunbestimmung von BERSON et al. (1956) wiesen bei der überwiegenden Zahl der Insulinresistenzen hohe Antikörpertiter im Serum nach und es wurde allgemein die Hypothese zugrunde gelegt,

daß Insulinantikörper das exogene Insulin neutralisieren und dadurch zu einer Insulinresistenz führen (BERSON und YALOW 1958, KERP et al. 1965, ROSSLIN 1965, DITSCHUNEIT und FEDERLIN 1966). Für diese Hypothese sprach außerdem, daß der Antikörpergehalt nach Überwindung der Resistenz wieder abnahm (FIELD 1962, PROUT und KATIMS 1960, SHIPP 1961). Die zwischen dem täglichen Insulinbedarf und der Antikörperkonzentration errechnete Korrelation ergab einen Koeffizienten von 0,53 und,wenn nur die hochaffinen Antikörper AK_1 in Betracht gezogen werden,von 0,61 nach KERP et al. 1968. LEVETT und KORP (1972) errechneten einen Korrelationskoeffizienten von 0,41 (persönliche Mitteilung) und WALDHÄUSL et al. (1972) an einer großen Anzahl von 299 Patienten einen Koeffizienten von 0,24. Man hätte für eine direkte Ursache-Wirkung-Beziehung zwischen Insulinantikörpern und täglichem Insulinbedarf höhere Korrelationskoeffizienten erwartet. Auch die alleinige Betrachtung der hochaffinen Antikörper AK_1 ist nicht völlig zufriedenstellend. Außerdem wurde wiederholt über Insulinresistenzen ohne Insulinantikörper berichtet (GRÜNEKLEE et al. 1971). Daher müssen neben der Rolle der Insulinantikörper immer noch andere Faktoren entweder immunologischer oder nicht immunologischer Genese erwogen werden (VALLANCE-OWEN et al. 1958, GRÜNEKLEE et al. 1972).

2. Bedeutung der Insulinresistenz

MARTIN et al. (1941) bemühten sich um eine Abgrenzung der Insulinresistenz von einem normalen Insulinbedarf und griffen auf Untersuchungen über den täglichen Insulinbedarf pankreasloser Hunde von ROOT (1929) zurück. Umgerechnet in E/kg Körpergewicht hätte ein pankreasloser Mensch 200 - 300 E/Tag benötigt. MARTIN setzte daher die untere Grenze für die Insulinresistenz bei 200 E/Tag an, wenn diese länger als 48 Stunden be-

nötigt werden. Entsprechend dieser Definition findet sie sich bei etwa 0,1 % aller insulinbehandelter Diabetiker (SHIPP et al. 1965, DAWEKE 1966, DEVLIN 1968, KERP et al. 1968). Wenige Jahre später, als man wegen Pankreas-Ca oder Insulinom Pankreatektomien beim Menschen durchführte, konnte der wirkliche Insulinbedarf des pankreaslosen Menschen ermittelt werden. Der normale Mensch braucht wesentlich weniger Insulin, im allgemeinen nur 20 - 40 E/Tag (CREUTZFELD et al. 1961). Einen ähnlichen Bedarf zeigen Diabetiker nach sekundärem Versagen der Sulfonylharnstofftherapie, nämlich 28 - 36 E/Tag (DITSCHUNEIT und FEDERLIN 1966). Theoretisch bestände schon eine Insulinresistenz, wenn mehr als 40 E/Tag benötigt werden. Klinischerseits hat jedoch eine solche Abgrenzung keine therapeutischen Konsequenzen. Daher bleiben manche Autoren bei der alten Definition. Andere setzen die Grenze bei 100 E/Tag fest, da bei solchen Dosen bereits klinische Probleme bei der Einstellung des Diabetes bestehen (DAWEKE 1966, DITSCHUNEIT und FEDERLIN 1966, FEDERLIN et al. 1971). Entsprechend dieser Definition findet sich die Insulinresistenz bei 3 - 4 % aller insulinbehandelter Diabetiker (DITSCHUNEIT und FEDERLIN 1966).

Fast alle insulinresistenten Patienten können mit unseren heutigen therapeutischen Methoden unter Kontrolle gebracht werden (PFEIFFER 1966). Entsprechend der Vorstellung einer immunologischen Genese der Insulinresistenz gibt es für die Therapie zwei Möglichkeiten der Beeinflussung entweder am Antigen oder an der Antikörperproduktion des Immunsystems. Das Antigen kann ganz vermieden werden, indem die Patienten bei strenger Diät auf orale Antidiabetica umgestellt werden (CREUTZFELD und SCHLAGINTWEIT 1957, DUNCAN et al. 1957, FRIEDLÄNDER 1957 u.a.). Es kann aber auch das ursprüngliche Insulin gegen ein weniger immunogenes Insulin ausgetauscht werden z.B. ein Monospezies-Schweineinsulin (KREUTZER et al. 1956, KÜHNAU und v.STRITZKY 1963, FANKHAUSER 1964), ein 10-fach kristallisiertes Insulin oder auch MC-Schweineinsulin (SCHLICHTKRULL et al. 1969, FANKHAUSER und MICHL 1971). Auch

modifizierte Insuline wie sulfatiertes Insulin können Erfolge zeigen (MOLONEY et al. 1964, LITTLE und ARNOTT 1966).

Statt das Antigen möglichst auszuschalten, kann man auch im Gegenteil dieses in besonders hohen Dosen i.v. injizieren,unter der Vorstellung,vielleicht eine partielle Hochdosistoleranz zu erreichen, wie dies von SHIPP et al.(1961)und von DAWEKE und BACH (1963 a,b) versucht worden ist. Diese Therapie zeigte gute Erfolge, aber nicht in allen Fällen. So kam es nach FEDERLIN et al. (1971) manchmal nur zu monatelangem Aufschub der Resistenz. Es sollte schwierig sein,bei einem schon stark vorsensibilisierten Patienten eine vollständige Toleranz zu erzeugen.

Die Beeinflussung der Antikörperproduktion kann durch sog. Immunsuppression versucht werden. Jedoch haben nur die Nebennierenrindenhormone eine gute Wirkung gezeigt (u.a. BERSON und YALOW 1958, EZRIN und MOLONEY 1959, DITSCHUNEIT et al. 1962), welche aber auch nicht immer nachzuweisen war (KAYE et al. 1955, KERP et al. 1965 u.a.). Es findet sich daher keine allgemein gültige Methode, um die Insulinresistenz unter Kontrolle zu bringen, sondern es muß die wirksamste Methode für jeden Patienten erneut erprobt werden (FEDERLIN et al. 1971). Trotz aller therapeutischer Fortschritte gibt es aber immer noch Fälle,die unserer heutigen Therapie entgleiten (PFEIFFER 1966).

II EXPERIMENTELLE IMMUNREAKTIONEN GEGENÜBER INSULIN

a) Insulinantikörper

1. Allergie-Antikörper und neutralisierende Antikörper

Die experimentelle Forschung interessierte sich anfangs dafür, die klinischen Komplikationen der Insulintherapie am Tiermodell zu studieren. So wurde nachgewiesen, daß Meerschweinchen, die

mit Insulin sensibilisiert waren, nur mit Insulin anaphylaktische Reaktionen zeigten, nicht aber mit Serumproteinen oder Pankreasextrakten (BARRAL und ROUX 1931). Auch versuchte man, die Insulinresistenz am Tiermodell nachzuahmen. Nach einem zunächst erfolglosen Versuch von WASSERMANN et al. (1940) konnten von mehreren Autoren durch Immunisation mit Insulin in Adjuvans Insulinantikörper zusammen mit Insulinresistenz gegenüber exogenem Insulin erzeugt werden, und zwar beim Kaninchen (LOWELL und FRANKLIN 1949, ARQUILLA und STAVITZKY 1956, BURROWS et al. 1957) und beim Meerschweinchen (MOLONEY und COVAL 1955, FREYTAG und MENKE 1970). Die insulinneutralisierende Wirkung des Serums auf die biologische Insulinaktivität konnte im Mäusekrampftest durch Neutralisation der erforderlichen Insulindosis gemessen werden (MOLONEY und COVAL 1955).

2. Insulinantikörper-Nachweismethoden

Während zunächst nur unempfindlichere Methoden zum Insulinantikörpernachweis bekannt waren, wie Komplementbindungsreaktionen und anaphylaktische Reaktionen, wurden in der folgenden Zeit sehr empfindliche Antikörpernachweismethoden entwickelt. ARQUILLA und STAVITZKY beschrieben 1956 die passive Hämolysemethode und BERSON et al. (1956) im gleichen Jahre die Radioimmunbestimmung mit radioaktiv markiertem Insulin. Bei dieser Methode bindet sich das radioaktive Insulin an Antikörper und wandert in der Papierelektrophorese mit den γ-Globulinen, während nicht an Antikörper gebundenes,freies radioaktives Insulin an der Auftragstelle an das Papier adsorbiert wird. Diese Radioimmunbestimmung wurde im Laufe der Jahre wesentlich modifiziert und erweitert, indem für die Trennung von gebundenem und freiem radioaktivem Insulin andere Methoden eingeführt wurden. Man kann diese Trennung grundsätzlich entweder durch Isolierung des freien Insulins oder des an Antikörper gebundenen Insulins erreichen. Die Trennung des freien Insulins erfolgte durch Adsorption an die Zellulose des Papierstreifens (BERSON et al. 1956) oder an Kohle-Dextran (HERBERT

et al. 1965), an Ionenaustauscher wie Amberlite (MEADE und KLITTGARD 1962), an Zellulosepulver (KERP und STEINHILBER 1963, WRIGHT und MALAISSE 1966, ZAHARKO und BECK 1968) oder an Talk (ROSSLIN et al. 1966). Für die Abtrennung des an Antikörper gebundenen Insulins eignen sich entweder ein gegen γ-Globulin gerichteter zweiter präzipitierender Antikörper (SKOM und TALMAGE 1958 a, HALES und RANDLE 1962, MORGAN und LAZAROW 1962) oder eine Natrium-Sulfit-Fällung (GRODSKY und FORSHAM 1960) oder eine Alkohol-Fällung der γ-Globuline (HEDING 1966, MAKULU et al. 1969). CHRISTIANSEN (1970) brachte eine weitere Modifikation zur Fällung der γ-Globuline und des darin enthaltenen gebundenen Insulins durch einen zweiten Antikörper, indem dieser in einer Trägerelektrophorese enthalten ist und das γ-Globulin in Zigarrenform ausfällt.

3. Antikörperklassen

Nach Immunisierung mit Insulin ließen sich in allen bisher bekannten Immunglobulinklassen Insulinantikörper nachweisen. Zu Beginn der humoralen Immunantwort finden sich IgM (SAMOLS und JONES 1965, DEVLIN 1966). Die Hauptmasse der neutralisierenden Antikörper sind jedoch IgG-Antikörper (MORSE und HEREMANS 1962, YAGI et al. 1963, CHAO et al. 1965 u.a.). IgA wurde bei einem Patienten mit generalisierter Sofortallergie gefunden (YAGI et al. 1963, CERASI et al. 1966). Auch die allgemein nur in geringer Konzentration vertretene Klasse der IgD wurde festgestellt (DEVEY et al. 1970). DOLOVICH et al. (1970) berichteten über Antikörper des Typ IgE bei einem Fall von generalisierter Insulinallergie. Insulinantikörper passieren die Plazenta und sind in fast gleicher Konzentration im fötalen Kreislauf nachweisbar (MEADE 1963). Während man beim Menschen bis auf Ausnahmen (PENCHEV 1968) keine präzipitierenden Antikörper fand, war es in verschiedenen Tierspezies möglich, durch Hyperimmunisation präzipitierende Antikörper zu erhalten, so beim Pferd (MOLONEY und APRILE 1959), beim Kaninchen (STEIGERWALD

et al. 1960, HIRATA und BLUMENTHAL 1962), beim Meerschweinchen (JONES und CUNLIFFE 1961, HIRATA und BLUMENTHAL 1962) und beim Schaf (BIRKINSHAW et al. 1962). Eine Vergrößerung des Insulinmoleküls durch Polymerisation kann eine immunologische Präzipitation ermöglichen, die mit normalem Insulin nicht entstehen würde (HEINZEL 1971).

4. Spezifität der Insulinantikörper

Insulinantikörper können gegen verschiedene Teile des Insulinmoleküls gerichtet sein. Welche antigene Determinante für die Antikörperbildung ausschlaggebend ist, hängt sehr stark von genetischen Faktoren ab, z.B. bilden die beiden Meerschweinchen-Inzuchtstämme 13 und 2 Antikörper gegen unterschiedliche Stellen am Insulinmolekül (ARQUILLA und FINN 1965). Gewisse chemische Veränderungen am Insulinmolekül, die die Konfiguration des Moleküls nicht verändern, beeinträchtigen nicht sehr die Antigenität des Insulins (GRODSKY und PENG et al. 1959, BRANDENBURG 1969, BRANDENBURG et al. 1972). Wenn jedoch die Konfiguration beeinträchtigt wird fällt die Antigenität stark ab (BRANDENBURG et al. 1971, JANSEN und BRANDENBURG 1970 und 1972). Nach einer Arbeit von WILSON et al. (1962) mit rekombinierten Insulinen, deren A- und B-Ketten von verschiedenen Spezies stammten, scheint die A-Kette für die Antigenität wichtiger zu sein als die B-Kette. Dabei ist die Konfiguration der Ketten im Gesamtmolekül entscheidend, da etwa 2/3 aller Antikörper nur mit dem intakten Molekül reagieren, während 1/3 der Insulinantikörper auch mit den isolierten Ketten reagieren kann (KERP et al. 1970).

b) Insulitis

1. Befunde bei Diabetikern

Schon am Anfang des Jahrhunderts, lange vor der Entdeckung des Insulins, wurde von OPIE (1901) eine Infiltration der Langerhansschen Inseln beschrieben, welche seit VON MEYENBURG

(1940) Insulitis genannt wurde. Sie besteht aus Infiltrationen von kleinen und größeren Lymphozyten und nur sehr selten polymorphkernigen Leukozyten (WARREN und ROOT 1925, WARREN 1927, STANSFIELD und WARREN 1928, WARREN und LECOMPTE 1952, GEPTS 1965, WARREN, LECOMPTE und LEGG 1966). Sehr häufig handelte es sich um Kinder oder Jugendliche, die bei einem Infekt plötzlich einen übermäßigen Durst bei hohen Blutzuckerwerten zeigten, komatös wurden und kurze Zeit danach, häufig in wenigen Tagen, starben (STEINER 1968). Bei den von GEPTS (1965) untersuchten 22 Fällen wurden bei 68 % Lymphozyteninfiltrate gefunden, die allerdings häufig nur aus wenigen Lymphozyten bestanden und nur einzelne Inseln befallen hatten. Sie können als Resterscheinung eines schon abgelaufenen umfangreicheren Prozesses gedeutet werden, der seinerseits schon vor dem Auftreten des Diabetes zu einer Verminderung der Inseln geführt hat. Eine plötzliche starke Beanspruchung durch einen Infekt würde dann den Insulinmangel und damit den offenen Diabetes aufzeigen, der in ein schweres Coma diabeticum führt. Bei Altersdiabetikern ist eine Insulitis erst in letzter Zeit und nur als sehr seltene Ausnahme beobachtet worden (LECOMPTE und LEGG 1972). Als Erklärung für die Entzündungsreaktion bieten sich folgende Möglichkeiten: ein Virusinfekt, eine Autoimmunerkrankung oder eine Kombination von beiden.

2. Virushypothese

Schon früh hatte man daran gedacht, daß das Mumpsvirus (PATRICK 1924, GUNDERSEN 1927, COLE 1934, KREMER 1947, MELIN und URSING 1958) oder ein anderes Virus einen Diabetes erzeugen könnten (SCHWARTZMAN et al. 1947, JOHN 1949, FARRELL et al. 1953, BROWN 1956). In den letzten Jahren gelang es CRAIGHEAD eine Variante des EMC-Virus zu züchten, die im Pankreas vorwiegend das Inselsystem schädigt und in der Maus zu einem Diabetes mellitus führt (CRAIGHEAD und Mc LANE 1968, CRAIGHEAD und STEINKE 1971). Es kommt zu einer überwiegenden Zerstörung des Inselsystems und zu einer Insulitis mit Makrophagen, polymorphkernigen Leukozyten und

Lymphozyten (MÜNTEFERING et al. 1970, 1971 und MÜNTEFERING 1972). Diese Befunde geben der Virushypothese neues Gewicht.

3. Immunologische Hypothesen

Die lymphozytäre Infiltration könnte auch eine gegen die Inseln gerichtete Autoimmunreaktion sein, da sie durch aktive Immunisation mit kristallinem Insulin im Tierversuch erzeugt worden ist, und zwar beim Kaninchen (TORESON et al. 1964 und 1968, GRODSKY et al. 1966, KLÖPPEL et al. 1972, 1973), beim Rind (RENOLD et al. 1964), beim Schaf und vereinzelt auch beim Meerschweinchen (FEDERLIN et al. 1968 und 1971). Ähnlich der Insulitis beim Menschen dominieren Lymphozyten gegenüber nur wenigen polymorphkernigen Leukozyten. Berichte über Insulitiden nach aktiver Immunisierung der Maus fehlten bislang. Eine solche Immunreaktion nach einer Virusinfektion, die das notwendige Antigen freisetzt und verändert, käme den bisherigen Befunden entgegen.

Im Gegensatz zu den Insulitiden nach aktiver Immunisation haben jene nach passiver Übertragung von Antikörpern einen anderen zytologischen Aspekt mit polymorphkernigen Leukozyten und Eosinophilen (LACY und WRIGHT 1965, LOGOTHETOPOULOS und BELL 1966, WRIGHT 1959, FREYTAG et al. 1970). Bei der Ratte erzeugt die passive Immunisation eine akute aber reversible leukozytäre Infiltration mit eosinophilen Leukozyten, bei der Maus nach einem akuten Stadium eine chronische, nicht reversible Infiltration mit überwiegend Lymphozyten und nur vereinzelten eosinophilen Leukozyten (FREYTAG et al. 1970). Rohe Pankreasextrakte hatten im passiven Immunisationsverfahren hauptsächlich zu Infiltrationen im exokrinen Pankreas geführt, kristallines Insulin dagegen mehr zu Lokalisationen in und um die Inseln (FREYTAG und KLÖPPEL 1969). Das Tiermodell der passiven Immunisierung läßt sich in der menschlichen Pathologie nur mit den

entzündlichen Infiltraten bei Kindern diabetischer Mütter vergleichen (Van BECK 1939, POTTER et al. 1941, SILVERMAN 1963), unter der Voraussetzung, daß diese Insulinantikörper produzieren, die in den fötalen Kreislauf übergehen (FREYTAG 1972).

c) Immunologisch erzeugte diabetische Symptome

1. Hyperglykämie und pathologische Glucosetoleranz

Seit den ersten aktiven Immunisierungsversuchen mit Insulin am Tier achtete man darauf, ob eine Erhöhung des Nüchternblutzuckers erfolgte. Anfangs hat man keine Erhöhung feststellen können, sowohl beim Kaninchen (LOWELL und FRANKLIN 1949, ARQUILLA und STAVITSKY 1956) als auch beim Meerschweinchen und beim Schaf (MOLONEY und COVAL 1955). Daraus schloß man, daß die gegen exogenes Insulin gerichteten Antikörper nicht mit endogenem Insulin reagieren würden. Erst TORESON et al. gelang es 1964 bei 2 von 5 Kaninchen einen Diabetes mellitus mit 300 - 400 mg% Nüchternblutzucker zu induzieren.

Hochpathologische Glukosetoleranzwerte (FREYTAG und MENKE 1970) wurden beim Meerschweinchen gesehen, während FEDERLIN 1971 keinen wirklichen Diabetes mellitus bei seinen langzeit-immunisierten Meerschweinchen gesehen hat. Es scheint also möglich zu sein, einen Immundiabetes experimentell zu erzeugen, aber er läßt sich nicht mit der Pathologie des menschlichen Diabetes vergleichen, da bei noch nicht mit Insulin behandelten Diabetikern keine Insulinantikörper gefunden wurden (BERSON und YALOW 1958, YALOW und BERSON 1960, SKOM und TALMAGE 1958). Es gibt zwar einzelne Publikationen über den Nachweis von Insulinantikörpern bei unbehandelten Diabetikern, jedoch müssen folgende beiden Einwände erhoben werden: 1. sehr häufig handelt es sich um nicht ganz zuverlässige Methoden und 2. es kann auch eine Insulinbehandlung stattgefunden haben, die dem Patienten nicht mehr gegenwärtig ist (PAV et al. 1963, MANCINI et al. 1964, CHETTY und WATSON 1965, DITZOV et al. 1971).

Im Gegensatz zu der aktiven Immunisierung ist es leichter, durch Übertragung von Antikörpern in eine andere Spezies vorübergehende diabetische Symptome zu erreichen. Nur Insulinantikörper vom Meerschweinchen und vom Huhn sind geeignet, in anderen Spezies eine vorübergehende Erhöhung des Blutzuckers mit Ketonurie und Gewichtsverlust zu erzeugen (WRIGHT et al. 1962, PATTERSON et al. 1964). Als Empfängertiere eignen sich die Maus (MOLONEY und COVAL 1955, FREYTAG und KLÖPPEL 1969), die Ratte (ARMIN et al. 1960, GREGOR et al. 1963, DIXIT et al. 1963), das Kaninchen (WRIGHT 1959, ARMIN et al. 1960), die Katze (ARMIN et al. 1960), der Hund (ARMIN et al. 1961, MANCINI et al. 1964), das Schwein (ARMIN et al. 1961), das Schaf und Rind (ARMIN et al. 1961, CUNNINGHAM et al. 1963) und die Ente (MIRSKY et al. 1964). Eine passive Übertragung von Insulinantikörpern käme in der menschlichen Pathologie nur bei Kindern diabetischer Mütter mit Insulinantikörpern vor und hätte daher für die Pathogenese des menschlichen Diabetes keine Bedeutung.

2. Diabetische Gefäßschäden

Die bei Diabetikern sehr häufigen Gefäßschäden wurden von einigen Autoren auf immunologische Ursachen zurückgeführt, da man mit Hilfe der Fluoreszenzmethode an diabetischen Gefäßläsionen Insulinantikörper nachweisen konnte (BERNS et al. 1962, COLEMAN et al. 1962, BLUMENTHAL et al. 1963). Sie können aber pathogenetisch nur eine aggravierende Wirkung gehabt haben, da die diabetischen Gefäßschäden schon lange vor der Entdeckung des Insulins und seiner therapeutischen Anwendung bekannt waren. Trotzdem ist es mehreren Autoren gelungen, durch aktive Immunisierung mit kristallinem Insulin am Kaninchen typische Nierenveränderungen zu erzeugen, die einem KIMMELSTIEL-WILSON-SYNDROM ähnlich erscheinen (GRIEBLE 1960, MOHOS et al. 1963, BLUMENTHAL et al. 1965, MANCINI et al. 1969, WEHNER et al. 1970). Andere Autoren wie FREYTAG und MENKE (1970) und FEDERLIN (1971) haben trotz ähnlicher Immunisierungen keine auffälligen Befunde an den Nieren erheben können.

III MÖGLICHKEITEN EINER IMMUNTOLERANZ GEGENÜBER INSULIN

Eine immunologische Toleranz gegenüber Insulin kann künstlich erzeugt werden und würde alle Immunreaktionen gegenüber Insulin unterdrücken. Bei einem in dieser Weise behandelten Diabetiker könnte man alle durch Insulin ausgelösten immunologischen Komplikationen verhindern. KERP et al. (1969) fanden nach 3-wöchiger Immunisation mit Insulin eine partielle Niedrigdosistoleranz beim Meerschweinchen. MOLONEY und TIRPAK (1969) erzeugten eine Toleranz gegenüber Insulin mit modifiziertem Insulin. Über die Immuntoleranz gegenüber Insulin sind keine weiteren Befunde in der Literatur bekannt, so daß viele Eigenschaften der Insulintoleranz zur Zeit nur in Analogie zu anderen Antigenen angenommen werden können. Daher wird hier dargestellt, was man bei der Insulintoleranz aufgrund anderer Erfahrungen erwarten würde.

a) Formen der Immuntoleranz

1. Embryonaltoleranz

Den Anstoß zur Erforschung der Toleranz gab OWEN (1945), als er bei Kälbern aus einem Wurf pro Tier zwei Erythrozytenpopulationen fand, die genuine und eine fremde, die über Plazentaanastomosen von einem Wurfgeschwister eingewandert war aber trotz ihrer körperfremden Antigene zeitlebens toleriert wurde. BILLINGHAM et al. (1953) und HASEK (1954) konnten dieses Naturphänomen erstmals experimentell nachahmen. Vor der Geburt und während einer nur kurzen Zeit nachher konnte diese Toleranz sowohl mit homologen Zellen (BILLINGHAM et al. 1953) als auch mit heterologen Proteinen (HANAN und OYAMA 1954, CINANDER und DUBERT 1955 u.a.), mit Polysacchariden (FELTON et al. 1955, STARK 1955 u.a.), mit Bakterienantigenen (WEISS 1958) und mit Virusantigenen (SCHWARTZ 1964) erzeugt werden. Es wird angenommen, daß der Kontakt einer übermäßig großen Antigenmenge mit der noch zu geringen Anzahl immunkompetenter Zellen des unreifen Immunsystems während der Embryonalzeit oder kurz danach zu einer Para-

lyse der Immunantwort führt (DRESSER und MITCHISON 1968). Ein ausgereiftes Immunsystem erwachsener Tiere hätte dagegen Antikörper erzeugt.

2. Erwachsenentoleranz

Nach Ausreifung des Immunsystems und Anwachsen der Population immunkompetenter Zellen werden immer höhere Antigendosen benötigt, um die Immunparalyse oder Hochdosistoleranz zu erreichen (DE WECK und FREY 1966, HRABA 1968). Bei manchen Antigenen,wie heterologen Erythrozyten,können die erforderlichen Mengen so groß werden, daß sie ohne letale Reaktionen nicht appliziert werden können (ALBRIGHT und EVANS 1965). Auch heterologe Proteine müssen in unerwartet hohen Mengen gegeben werden, können aber wesentlich verringert werden, wenn sie über lange Zeit verabreicht werden, wie MITCHISON (1964 und 1968) mit Albumin zeigte. Mittlere Dosen erzeugen im allgemeinen eine Immunantwort, noch kleinere Dosen dagegen bei manchen Antigenen eine zweite Art der Toleranz, die Niedrigdosistoleranz. Sie wurde nachgewiesen für Serumalbumin (MITCHISON 1964), das Bakterienprotein Flagellin (SHELLAM et al. 1968), Bakteriophagen (KÖLSCH und DILLER 1971) und auch Insulin (KERP et al. 1969). KERP et al. erreichten durch eine 3 Wochen lange Vorbehandlung von Meerschweinchen mit nicht immunogenen Dosen von Insulin eine partielle Niedrigdosistoleranz, bei welcher nur 30 % der normalen Antikörperproduktion übrig blieb. Die Niedrigdosistoleranz erscheint für die klinische Anwendung zunächst sehr interessant zu sein, hat aber, wie später ausgeführt, Grenzen bei ihrer praktischen Anwendung in der Insulintherapie. Eine Hochdosistoleranz mit nicht modifiziertem Insulin wurde in der Literatur wegen der zu hohen, toxischen Dosen nicht beschrieben. Mit modifiziertem biologisch wenig aktivem Insulin, Maleyl-Insulin, erreichten MOLONEY und TIRPAK (1969) jedoch nach 3-wöchiger Applikation in hohen Dosen eine Insulintoleranz beim Meerschweinchen. Die Form der Toleranzerzeugung von MOLONEY und TIRPAK (1969) mit Freundschem Adjuvans

ließe sich beim Menschen nicht anwenden.

3. Immunsuppressionstoleranz

Entsprechend der Vorstellung, daß die Erwachsenentoleranz auf dem gleichen Prinzip beruht wie die Embryonaltoleranz (HRABA 1968), müßte man nach einer Reduktion der immunkompetenten Zellen durch Immunsuppression wieder mit kleinen Antigendosen eine Toleranz erzeugen können. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde nach einer ausreichenden Immunsuppression entweder mit Bestrahlung oder mit chemischen Immunsuppressiva die Toleranz auch beim erwachsenen Tier mit Dosen/kg Körpergewicht erzeugt, die den Dosen der Embryonaltoleranz entsprachen (DRESSER und MITCHISON 1968). Die chemische Immunsuppression, wie sie bei der Insulinresistenz vorgenommen wurde, kann in solcher Weise gewirkt haben, um die Insulinantikörpertiter zu senken. Während alkylierende Substanzen, die die DNS-Synthese hemmen, am Tier (DEVLIN und BRIEN 1965) und wahrscheinlich auch am Menschen (KRÜGER 1966) die Antikörperproduktion unterdrücken konnten, wurde mit der Gruppe der Antimetaboliten und mit Stickstoff-Lost kein deutlicher Erfolg verzeichnet (MERRIMEE 1965, KERP 1968 b, u.a.). Wie vorher erwähnt, hatte die Behandlung mit Nebennierenrindenhormonen dagegen bei der Insulinresistenz einen deutlichen Erfolg gezeigt, aber nicht bei allen Fällen.

4. Antikörpertoleranz

Passiv zugeführte, spezifische Antikörper können ebenfalls eine Toleranz bewirken (UHR und BARMANN 1961, MÖLLER 1964). Die Antikörper können das Antigen entweder peripher abdecken oder zentral als negativer Rückkoppelungsmechanismus eine Hemmung der Antikörpersynthese bewirken. Nach FELDMANN und DIENER (1971) könnte besonders die Niedrigdosistoleranz auf eine geringe Menge im Körper gebildeter Antikörper mit zentraler Hemmwirkung zurückgeführt werden, nach WEBER und KÖLSCH (1972) dagegen auf ein Versagen des Umspringens der IgM-Produktion auf eine IgG-Produktion.

b) Eigenschaften der immunologischen Toleranz

1. Dauer der Toleranz

Zur Erhaltung der Toleranz muß das Antigen ständig vorhanden sein (DRESSER und MITCHISON 1968). Während lebende Zellen durch ihre Selbstvermehrung die Membranantigene stets neu erzeugen, müssen nicht selbst vermehrungsfähige Antigene ständig neu zugeführt werden, sonst kehrt das Immunsystem wieder in seine normale Reaktionslage zurück und erzeugt Antikörper (MITCHISON 1965). Da die notwendigen Erhaltungsdosen pro kg Körpergewicht der Embryonaltoleranz entsprechen (MITCHISON 1968), dürften bei einer einmal erreichten starken Insulintoleranz die therapeutischen Dosen für die Diabetesbehandlung zur Erhaltung der Toleranz ausreichen.

2. Spezifität der Toleranz

Die immunologische Toleranz ist spezifisch gegen das Antigen gerichtet, welches sie erzeugt hat. Daher erfolgt trotz des Bestehens einer Toleranz gegenüber einem bestimmten Antigen eine normale Antikörperantwort gegenüber allen anderen Antigenen, die mit dem tolerierten keine Kreuzreaktion besitzen. Dies wurde sowohl für Polysaccharide (FELTON et al. 1955) als auch für Proteine (DIXON und MAURER 1955) nachgewiesen. Daher bleibt die immunologische Abwehr voll erhalten.

3. Grundlagen der Toleranz

Die Bildung von Antikörpern erfordert mindestens zwei antigene Determinanten (RAJEWSKY et al. 1969), die für eine Kooperation von B-und T-Zellen notwendig sind (WEIGLE 1971). Die B-Lymphozyten (aus dem Knochenmark stammend) produzieren die Antikörper, während die T-Lymphozyten (aus dem Thymus stammend) hierbei wahrscheinlich nur eine Helferfunktion haben. Eine Toleranz entsteht aber schon, wenn nur eine der beiden Zellarten

tolerant wird. Die T-Zellen werden aber mit kleineren Dosen und nach kürzerer Zeit bei thymusabhängigen Immunogenen tolerant als die B-Zellen (WEIGLE 1971). Ob Insulin zu den thymusabhängigen Immunogenen gehört, muß noch geklärt werden.

c) Einfluß des Antigens auf die Toleranz

1. Toleroimmunogenität

DRESSER und MITCHISON (1968) teilten die Antigene nach ihren immunogenen Eigenschaften in drei Klassen ein, in starke Immunogene schwache Immunogene und Nicht-Immunogene. Die starken Immunogene, wie Diphtherietoxoid, Lysozym und Ovalbumin erzeugen bereits in ganz kleinen Dosen Antikörper, so daß keine Niedrigdosistoleranz entstehen kann (MITCHISON 1968). Die schwachen Immunogene, wie Serumalbumin, führen in kleinen Dosen nicht mehr zur Antikörperbildung, sondern zu einer Niedrigdosistoleranz. Mittlere Dosen bewirken eine Antikörperbildung, hohe dagegen wieder eine Toleranz. Neben diesen beiden Kategorien gibt es die Nicht-Immunogene, welche in reiner Form, d.h. ohne Aggregatbildung und ohne Adjuvans keine Antikörper mehr erzeugen können (DRESSER und MITCHISON 1968). Einer der Faktoren, die auf die Toleroimmunität einwirken, ist das Molekulargewicht. Insulin und Glukagon mit ihrem Molekulargewicht von 6 000 bzw. 3 600 gehören zu der Gruppe der kleinsten noch immunogenen Substanzen, während Peptidhormone wie Vasopressin und Oxitozin schon zu klein sind, um Antikörper zu produzieren. Sie verhalten sich bereits wie Haptene (HUMPHREY und WHITE 1964).

2. Kreuzreaktion mit anderen Antigenen

Eine Kreuzreaktion mit körpereigenen Proteinen, gegenüber denen bereits eine natürliche Toleranz besteht, vermindert die Immunogenität eines Antigens und läßt es an der bestehenden natürlichen Toleranz teilnehmen. Schweineinsulin, welches nur eine andere Aminosäure als Kaninchеninsulin besitzt, erzeugt wesentlich weniger Antikörper bei Kaninchen als Rinderinsulin, welches drei

verschiedene Aminosäuren aufweist (SCHLICHTKRULL et al. 1972). Sehr ähnliche Verhältnisse der Immunogenität von Schweine- und Rinderinsulin finden sich auch beim Menschen (DEVLIN 1966).

Eine Kreuzreaktion kann aber auch eine Toleranz brechen. Wurde nach der Einleitung einer Toleranz ein mit dem Antigen kreuzreagierendes zweites Antigen gegeben, so wurde die Toleranz gebrochen (CINANDER und DUBERT 1955), jedoch nur bei einer geringen Kreuzreaktion von etwa 15 %, nicht aber bei hoher Kreuzreaktion von etwa 75 % (WEIGLE 1961). Dieses Problem ist wichtig, wenn man beim Diabetiker mit modifizierten Insulinen eine immunologische Toleranz erzeugen will. Dann muß das modifizierte Insulin eine möglichst hohe Kreuzreaktion mit dem später zu verwendenden therapeutischen Insulin aufweisen, sonst würde die Toleranz gegenüber dem modifizierten Insulin durch das therapeutische Insulin wieder aufgehoben. Das modifizierte Insulin muß daher für die Toleranzeinleitung nach seiner Kreuzreaktion mit Insulin ausgesucht werden.

C EIGENE FRAGESTELLUNG

Einige Ziele immunologischer Forschung im Zusammenhang mit dem Diabetes mellitus bestehen darin, erstens die humorale Immunreaktion, d.h. die Antikörperbildung gegenüber Insulin, entweder durch eine immunologische Toleranz, durch eine Hochreinigung des Insulins oder durch eine Kombination beider Möglichkeiten zu unterdrücken. Die gleiche Aufgabe stellt sich zweitens hinsichtlich der zellulären Immunreaktion, d.h. der verspäteten Hautreaktion und der Insulitis. Beide Reaktionen sollten durch die oben genannten Möglichkeiten verhindert werden können. Die Grundlagen hierzu müssen zunächst am Tierexperiment geschaffen werden.

In der Literatur wurde beschrieben, daß sich bei der Immunisation von Kaninchen und Meerschweinchen mit Insulin neben der humoralen und zellulären Reaktion noch ein Immundiabetes oder seine Vorstufe, eine immunologisch bedingte pathologische Glucosetoleranz herausbildete. Dies wurde auf die gegen Insulin gerichteten Antikörper zurückgeführt, die dessen biologische Wirkung hemmen. In ähnlicher Weise scheinen beim insulinbedürftigen Diabetiker Insulinantikörper die diabetische Stoffwechsellage zu verschlechtern. Daher ist es drittens wichtig, beim Experimentaltier zu prüfen, ob die Hochreinigung oder die immunologische Toleranz auch das Entstehen einer pathologischen Glucosetoleranz verhindern können. Zur Untersuchung dieser Fragen haben wir die Maus gewählt, die nach der Literatur bisher nur sehr wenig für solche Untersuchungen gewählt wurde. Aus dem genannten Problemkreis ergeben sich 4 wesentliche Fragestellungen:

I. Immunologische Toleranz und Antikörperbildung nach Immunisation mit unreinem Insulin

II. Immunologische Toleranz und Antikörperbildung nach Immunisation mit hochgereinigtem Insulin

III. Einfluß der Immuntoleranz und der Reinheit des Insulins auf die Insulitis

IV. Einfluß der Immuntoleranz und der Reinheit des Insulins auf die Glucosetoleranz

Diese Fragestellungen sollen zunächst im einzelnen besprochen werden.

I. IMMUNOLOGISCHE TOLERANZ UND ANTIKÖRPERBILDUNG NACH IMMUNISATION MIT UNREINEM INSULIN

Ein Antigen besitzt im allgemeinen sowohl die Fähigkeit zur Bildung von Antikörpern als auch zur Erzeugung einer Toleranz. Eine immunologische Toleranz ist eine durch das Antigen induzierte Unfähigkeit des Immunsystems gegen dasselbe Antigen gerichtete Antikörper zu bilden. Bemerkenswerterweise werden sowohl die Antikörperstimulation als auch die Toleranz durch Immunisationen mit dem entsprechenden Antigen erzeugt. MITCHISON (1964) hat die Zeit- und Dosisabhängigkeit der Immunreaktionen gegenüber Albumin an der Maus untersucht und später (MITCHISON 1967) in Form eines dreidimensionalen Reaktionsmodells veranschaulicht. Er stellte erstmals fest, daß es mit Albumin neben der schon bekannten Toleranz durch hohe Dosen, der Hochdosistoleranz, auch eine solche durch besonders niedrige Dosen, die Niedrigdosistoleranz, gab. Beide Toleranzzonen waren durch eine Zone der Antikörperstimulation getrennt. Sowohl für die Toleranzzonen als auch die zwischen beiden liegende Stimulationszone war eine bestimmte Dauer der Immunisation erforderlich. Andere von MITCHISON (1968) untersuchte Antigene zeigten nur die Hochdosistoleranz. SHELLAM und NOSSAL fanden ein zweites Antigen mit zwei Toleranzzonen, das Bakterienprotein Flagellin aus

Salmonella Adelaide. Jedoch waren hier die erforderlichen Dosen wesentlich kleiner im Vergleich zu Albumin.

Mit Insulin erschien es wegen der benötigten hohen Überdosen schwierig, eine Hochdosistoleranz zu erreichen, während eine Niedrigdosistoleranz eher erreichbar sein sollte. KERP et al. war es 1969 am Meerschweinchen gelungen, eine Niedrigdosistoleranz mit einer restlichen Antikörperbildung von nur 30 % zu erzeugen. Hierzu benötigte er eine Immunisationszeit von 3 Wochen mit sehr niedrigen Dosen und würde wahrscheinlich bis zur Erreichung einer vollständigen Toleranz, d.h. dem Verschwinden der restlichen Antikörperbildung, eine noch längere Immunisationszeit beansprucht haben. Die Anwendung der Niedrigdosistoleranz beim Menschen stößt daher auf Schwierigkeiten. Da die hier notwendigen, auf den Menschen umgerechneten Insulindosen, weit unterhalb der therapeutischen Dosierung liegen, müßte die Niedrigdosistoleranz bei insulinbedürftigen Diabetikern mehrere Wochen bis Monate vor dem Beginn der Insulintherapie erzeugt werden. Sie wäre nicht mehr praktikabel, wenn ein akuter Insulinbedarf eine sofortige Therapie notwendig macht. Eine Niedrigdosistoleranz müßte daher hauptsächlich prophylaktisch bei solchen Patienten angewandt werden, die das Risiko tragen, einen Insulinmangeldiabetes zu erhalten. Die nur prophylaktische Anwendbarkeit schränkt allerdings ihre Anwendbarkeit beim Menschen ein.

Solche Schwierigkeiten könnten umgangen werden, wenn man die Toleranz gegenüber Insulin wie MOLONEY und JACKSON (1973) mit dem modifizierten, biologisch wenig aktiven Maleylinsulin in inkomplettem Freundschen Adjuvans erzeugt, da hier ein sehr breiter Dosisbereich wirksam ist und eine gleichzeitige Insulintherapie durch das biologisch wenig aktive Maleylinsulin nicht gestört wird. Leider ist die Anwendung von inkomplettem Freundschen Adjuvans, welches leicht zu Abszessen führt, eine wesentliche Voraussetzung dieser Toleranzerzeugung. Sie kann daher nicht in dieser Form beim Menschen angewandt werden.

Die Erzeugung einer Hochdosistoleranz mit nicht modifiziertem Insulin würde wahrscheinlich eine starke Überdosierung verlangen, die zu lebensbedrohlichen Insulinschocks führen müßte. Wenn man hier jedoch ein anderes modifiziertes Insulin als MOLONEY und JACKSON (1973) mit nur geringer biologischer Aktivität finden könnte, welches zur Toleranzerzeugung kein inkomplettes Freundsches Adjuvans benötigt, ließe sich auch eine Hochdosistoleranz klinisch anwenden. Im Gegensatz zur Niedrigdosistoleranz braucht sie nicht prophylaktisch eingeleitet zu werden, da die benötigten Dosen oberhalb der therapeutischen Dosen liegen werden, so daß die gleichzeitig durchgeführte Insulintherapie eine Toleranzerzeugung nicht stören würde. Andererseits würde mit einem kaum noch biologische Aktivität enthaltenden modifizierten Insulin auch die Insulintherapie nicht gestört werden. Man könnte sich die Erzeugung einer Hochdosistoleranz beim Menschen so vorstellen, daß mit dem Beginn einer normalen Insulintherapie gleichzeitig ein biologisch inaktives Insulin in hohen Dosen verabreicht wird, welches innerhalb einiger Monate eine Toleranz erzeugen könnte und dann abgesetzt würde. Danach sollten die Dosen des therapeutisch verwandten normalen Insulins in der Lage sein, die Toleranz zu unterhalten.

Unser eigenes Ziel bestand darin, an der Maus mit unmodifiziertem Schweineinsulin die Dosen für die Erzeugung einer Hoch- und Niedrigdosistoleranz und die notwendige Immunisationszeit zu ermitteln, um daraufhin abschätzen zu können, welche Dosen eines möglichst inaktiven Insulins bei der Einleitung einer Toleranz bei insulinbedürftigen Diabetikern erforderlich sein dürften.

II. IMMUNOLOGISCHE TOLERANZ UND ANTIKÖRPERBILDUNG NACH IMMUNISATION MIT HOCHGEREINIGTEM INSULIN

Kristallines Insulin, auch wenn es mehrfach kristallisiert wurde, enthält noch kontaminierende Proteine, die sich von dem wahren Sangerinsulin, d.h. jenem Insulin, welches genau der

Sangerschen Formel entspricht (SANGER 1960), unterscheiden (MIRSKY und KAWAMURA (1969), STEINER et al. (1968)). SCHLICHTKRULL et al. (1969) zeigten, daß ein auf Sephadex G-50 chromatographiertes einmal kristallisiertes Insulin etwa 10 % höhermolekulare Proteine enthält, u.a. Proinsulin, intermediäres Insulin, dimeres Insulin, andere Insulinderivate und noch uncharakterisierte Proteine. Weitere 10 % haben zwar ein ähnliches Molekulargewicht wie Insulin, unterscheiden sich aber von diesem in ihrer Aminosäurenzusammensetzung wie Desamidoinsulin und andere.

Die höhermolekularen Insulinderivate waren stärker immunogen als das durch Gel- und Ionenaustauscherchromatographie gereinigte Schweine- oder Rinderinsulin (Monokomponent oder MC-Insulin von Novo), welches bei einer 6-monatigen Immunisation von Kaninchen keine Antikörper erzeugte (SCHLICHTKRULL et al. 1972). Bei der klinischen Anwendung des MC-Schweineinsulins wurden von SCHLICHTKRULL et al. (1969 und 1972) und von FANKHAUSER und MICHL (1971) keine Antikörper gefunden, während LEVETT und KORP (1972 b) und KÜHNAU (1972) noch geringe Antikörpertiter feststellten. Die geringe Antikörperbildung des MC-Insulins wurde als eine Verringerung seiner Immunogenität angesehen. KERP (1970) konnte jedoch die stärkere Immunogenität von kommerziellen Insulinen nicht bestätigen und hat bei einer sehr breit angelegten und langdauernden Studie mit chromatographiertem Rinderinsulin (CR-Insulin von Hoechst) am Diabetiker keinen signifikanten Unterschied der Antikörperkonzentration gegenüber nur kristallinem Insulin feststellen können (KERP 1973).

NOSSAL et al. (1965) berichteten, daß ein monomeres Flagellin eine höhere Tolerogenität bei der Erzeugung einer Hochdosistoleranz besitzt als polymeres Flagellin, da es hierzu nur eine 10-fach niedrigere Dosierung benötigte. Ein Spaltprodukt des monomeren Flagellins mit einem MG von etwa 18 000 war kaum noch immunogen aber stark tolerogen (PARISH und ADA

1969 b). Da dem MC-Insulin die höhermolekularen Anteile des kristallinen Insulins fehlen und es nur ein MG von etwa 6 000 besitzt, könnte es in ähnlicher Weise wie Flagellin tolerogener sein als ein unreines Insulin.

Unsere eigene Fragestellung befaßte sich daher damit, ob das Fehlen der höhermolekularen Unreinheiten des Insulins die Antikörperbildung vermindere und möglicherweise die Tolerogenität erhöhe.

III. EINFLUß DER IMMUNTOLERANZ UND DER REINHEIT DES INSULINS AUF DIE INSULITIS

Die Insulitis, eine lymphozytäre Infiltration der Langerhansschen Inseln, wurde am häufigsten bei noch nicht behandelten, schnell verstorbenen jugendlichen Diabetikern gefunden. Nur in wenigen Fällen fand man sie auch beim spät manifesten Diabetes (LECOMPTE und LEGG 1972). Durch Immunisation mit kristallisiertem Insulin entstand sie jedoch recht häufig beim Kaninchen (TORESON et al. 1964, KLÖPPEL et al. 1972). Die Therapie des Diabetikers mit Insulin birgt daher die Gefahr in sich, auch zu einer Insulitis zu führen. Wenn die Annahme richtig ist, daß sie eine zelluläre Reaktion gegen Insulin ist (FREYTAG 1972), müßte sie,wie auch die Antikörperbildung, durch eine immunologische Toleranz gegenüber Insulin verhindert werden. Daher ist es wichtig, bei der Toleranzerzeugung auch die Insulitis mit zu untersuchen.

Nachdem bekannt wurde, daß kristallines Insulin, mit dem die experimentelle Insulitis erzeugt worden war, Unreinheiten enthielt, entstand die weitere Frage, ob das wahre Sangerinsulin allein oder seine Unreinheiten für das Auftreten der Insulitis verantwortlich waren. Die von uns geplanten Immunisationen an Mäusen mit einmal kristallisiertem Insulin und MC-Insulin erlaubten es, zu untersuchen, wie sich beide Insulinchargen in Hinsicht auf die Insulitis verhielten. Falls hochgereinigtes

Insulin eine Insulitis mit kleineren Dosen erzeugt, spräche dies dafür, daß das reine Sangerinsulin hierfür verantwortlich ist, falls jedoch unreines Insulin die Insulitis mit kleineren Dosen entstehen läßt, spräche dies für eine Beteiligung der kontaminierenden Proteine. Wir stellten uns daher die Fragen, ob die immunologische Toleranz gegenüber Insulin eine Insulitis verhindern könne und ob sich bei der Erzeugung der Insulitis Unterschiede zwischen einmal kristallisiertem Insulin und MC-Insulin ergäben.

IV. EINFLUß DER IMMUNTOLERANZ UND DER REINHEIT DES INSULINS AUF DIE GLUCOSETOLERANZ

Immunisationen mit kristallinem Insulin erzeugten bei Experimentaltieren diabetische Symptome: eine gestörte Glucosetoleranz beim Meerschweinchen (FREYTAG und MENKE 1970) und einen Diabetes mellitus beim Kaninchen (TORESON et al. 1964, GRODSKY et al. 1966). Die Insulintherapie des Diabetikers führt in ähnlicher Weise bei einem Teil der Patienten zu einem erhöhten Insulintagesbedarf. Wegen des gleichzeitigen Erscheinens von Insulinantikörpern wurde immer angenommen, daß diese durch Neutralisation der biologischen Aktivität des Insulins den Glucosemetabolismus störten und zu einem erhöhten Insulinbedarf führten (BERSON et al. 1956, BERSON und YALOW 1958, DEVLIN und BRIEN 1965, DITSCHUNEIT und FEDERLIN 1966, KERP et al. 1968 OAKLEY et al. 1967 u.a.). Eine immunologische Toleranz sollte daher auch die Störung der Glucosetoleranz verhindern können.

Seit der Kenntnis der Unreinheiten in kristallinem Insulin entstand hier ebenfalls die Frage, wie weit diese an der gestörten Glucosetoleranz beteiligt sind und ob ihre Beseitigung die Entwicklung einer Insulinresistenz verhindern könne. Nach Ausbruch eines Diabetes mellitus, jedoch vor dem Beginn einer Insulintherapie, wurden keine Insulinantikörper festgestellt (BERSON und YALOW 1958). Daher könnte ein experimenteller

Immundiabetes, der auf Insulinantikörpern beruht, nicht zu dem menschlichen Diabetes in Beziehung gesetzt werden. Falls der Immundiabetes am Tier jedoch auf der Immunisation von einem kontaminierenden und nicht mit Insulin verwandten Antigen beruht, welches am Glucosemetabolismus beteiligt ist, wären erneute klinische Nachprüfungen erforderlich, um eine solche Pathogenese beim menschlichen Diabetes nachzuweisen oder auszuschließen.

Für uns entstand die Frage, ob eine immunologische Toleranz gegenüber Insulin das Entstehen einer pathologischen Glucosetoleranz verhindern könne und ob unreines oder hochgereinigtes Insulin die Glucosetoleranz stärker beeinflusse.

D EIGENE VERSUCHE

I. VERSUCHSANSATZ

Die Erzeugung einer immunologischen Toleranz in Anlehnung an MITCHISON (1964) erforderte:

um die Toleranz zu erzeugen,
eine Immunisationsperiode mit häufigen intraperitonealen Injektionen von löslichem Insulin ohne Adjuvans

um die Toleranz nachzuweisen,
eine einmalige Testimmunisation mit der stärksten immunogenen Dosis von Insulin in komplettem Freundschen Adjuvans und mehrfache Kontrollen der Antikörperbildung in der anschließenden Testperiode.

Hier wird zum besseren Verständnis zunächst nur das Schema der Versuchsanordnung besprochen. Einzelheiten finden sich im Abschnitt Methoden.

a) Immunisationsperiode

Da die Dosis und die Dauer der Immunisation für die Entstehung einer Toleranz entscheidend sind, wurden Gruppen von je 10 Versuchstieren mit verschiedenen Dosen und verschieden langen Immunisationsperioden untersucht. Wegen der notwendigen hohen Tierzahlen eigneten sich besonders Mäuse. Sie wurden 3 mal pro Woche montags, mittwochs und freitags i.p. je nach Gruppe einen halben Monat, einen Monat, zwei Monate oder drei Monate lang immunisiert (ein Monat = 4 Wochen) (Abb. 1).

Vor der Immunisationsperiode und am 11. Tag nach der letzten Immunisation wurden durch orbitale Punktion Blutproben entnommen, um die Antikörpertiter zu bestimmen. Das Blut konnte erst am 11. Tag abgenommen werden, damit die Antikörper nicht durch das neu zugeführte Insulin absorbiert und dadurch maskiert waren. Zwei Tage später, am 13. Tag nach der letzten

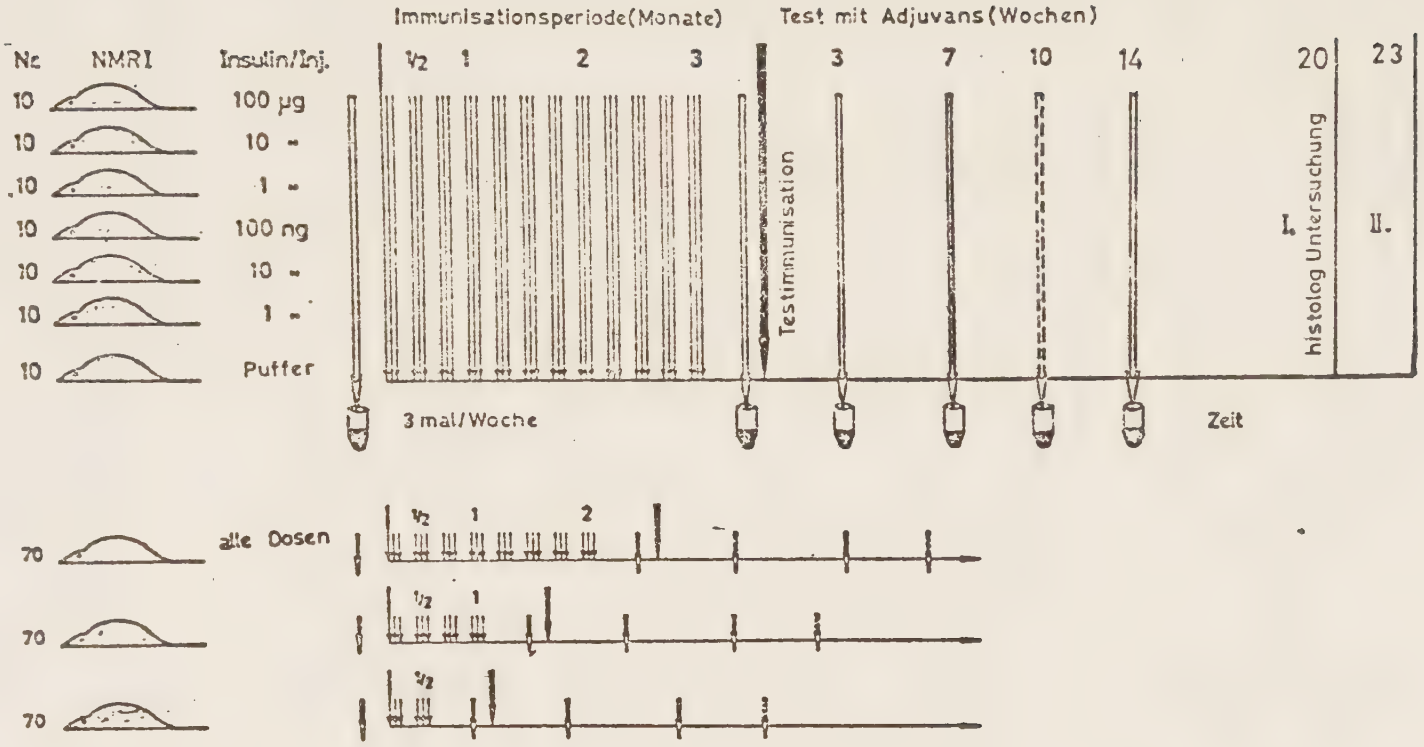


Abb.: 1

Immunisationsschema für die Erzeugung (Immunisationsperiode) und für die Prüfung der Toleranz (Testimmunisation). Gruppen von 10 NMRI-Mäusen werden mit sechs verschiedenen Dosen und eine Gruppe mit Puffer (obere Abb.) über verschieden lange Zeit (untere Abb.) mit Insulin ohne Adjuvans immunisiert, bevor sie die Testimmunisation mit Adjuvans erhalten. Blutabnahmen erfolgen vor dem Versuch, vor der Testimmunisation und 3,7,10, und 14 Wochen nach der Testimmunisation.

Immunisation, erfolgte die Testimmunisation mit komplettem Freundschen Adjuvans.

Da die Erzeugung einer Toleranz eine ununterbrochene Immunisation mit löslichem Antigen ohne Adjuvans erforderte, konnte sie nach der 11 Tage langen Unterbrechung und der Verwendung von Adjuvans bei der Testimmunisation nicht mehr an den gleichen Tieren durch längere Immunisation vertieft werden. Daher wurden mehrere Gruppen von Mäusen zur gleichen Zeit und mit den gleichen Dosen aber über eine verschieden lange Immunisationsperiode mit Insulin immunisiert. Dies erforderte die vier erwähnten Immunisationsperioden von 1/2, 1, 2 und 3 Monaten. Für die gleichzeitige Immunisation mit den beiden Insulinchargen wurde die doppelte Anzahl von Gruppen jedoch ohne weitere Kontrollgruppen benötigt.

Die Höchstdosis von Insulin sollte derjenigen Dosis entsprechen, welche von nicht fastenden Mäusen bei Applikation von 2 ml einer 20 %igen Glucoselösung ohne Schock gerade noch vertragen wurde. In Vorversuchen wurde die Höchstdosis als 100 µg pro Maus von etwa 25 - 30 g ermittelt. Weitere Dosen waren die folgenden fünf 1 : 10 Verdünnungen der Höchstdosis, d.h. 10 µg, 1 µg, 100 ng, 10 ng und 1 ng. Alle Dosen wurden für den gesamten Versuch nur einmal angesetzt und bis zum Gebrauch bei - 20° aufbewahrt, um stets die gleiche Dosierung zu gewährleisten. Die vier Kontrollgruppen erhielten Puffer statt Insulin während der Immunisationsperiode. Eine zusätzliche Kontrollgruppe hat keine Pufferinjektionen erhalten.

b) Testimmunisation

Bei der Testimmunisation wurde allen mit Insulin vorimmunisierten Tieren und der Hälfte der mit Puffer vorimmunisierten Kontrollgruppen (1 Monat und 3 Monate Vorimmunisation) sowie der Kontrollgruppe ohne Pufferinjektionen die höchste Insulindosis von 100 µg 1 x krist. Schweineinsulin in komplettem Freundschen Adjuvans gegeben. Jene Kontrollgruppen, welche bei der Testimmunisation Freundsches Adjuvans ohne Insulin er-

hielten (Kontrollgruppen nach 1/2 und 2 Monaten Vorbehandlung mit Puffer), wurden negative Kontrollen genannt, sie sollten keine Antikörper bilden. Jene aber die die gleiche Insulindosis wie die vorimmunisierten Tiere erhielten (Kontrollgruppen nach 1 und 3 Monaten Vorbehandlung mit Puffer und jene ohne Pufferinjektion) wurden positive Kontrollen genannt, da sie die Antikörperentwicklung von "normalen", nicht mit Insulin vorbehandelten Tieren anzeigten.

Es wurde erwartet, daß sich im Vergleich zu den positiven Kontrollgruppen zwei unterschiedliche Entwicklungen der Antikörpertiter darstellen, welche stimulierte oder tolerante Tiergruppen andeuteten (Abb. 2). Stimulierte Tiergruppen sollten schon im Verlauf der Immunisationsperiode vor der Testimmunisation Antikörper haben, deren Titer sich durch die Testimmunisation noch erhöhen konnte, so daß sie in jedem Falle wesentlich mehr Antikörper bildeten als die positiven Kontrollen. Tolerante Tiergruppen dagegen sollten trotz der starken Stimulation durch die Testimmunisation mit Adjuvans kaum noch Antikörper produzieren können und zumindest weit unter dem Antikörpertiter der Kontrollen bleiben. MITCHISON (1964) sprach von Stimulation, wenn die Mittelwerte von Tiergruppen mehr als 200% der Werte der positiven Kontrollen ausmachten. Gruppen mit mittleren Antikörpertitern zwischen 10 % und 50 % der positiven Kontrollen wurden als schwach tolerant und solche mit weniger als 10 % als stark tolerant angesehen. Nach der Testimmunisation wurde der Anstieg und das weitere Verhalten der Antikörpertiter mit mehrmaligen Blutabnahmen in der sogenannten Testperiode beobachtet, bevor die Tiere getötet und histologisch auf eine Insulitis untersucht wurden. Um die histologischen Befunde zu intensivieren, wurde bei der Hälfte der Tiere noch eine zweite Testimmunisation verabfolgt und diese Gruppe erst drei Wochen nach der ersten getötet. Die Histologie wurde von Herrn Dr. Freytag in Hamburg ohne Kenntnis der Vorbehandlung (Blindversuch) durchgeführt.

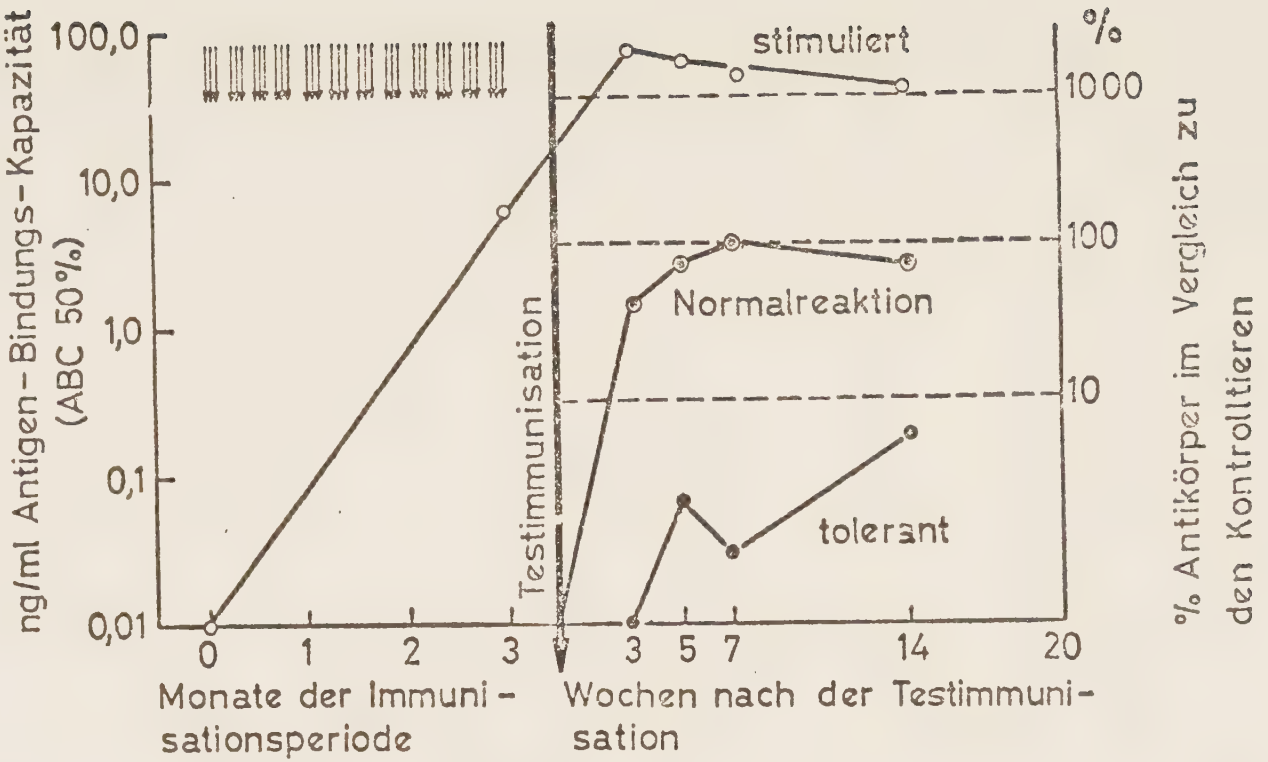


Abb.: 2

Schema der Entwicklung von Insulinantikörpern vor und nach der Testimmunisation mit komplettem Freundschen Adjuvans, die zwischen der Normalreaktion, der Stimulation der Antikörperbildung und der Toleranz differenziert. Linke Ordinate: Antikörperkonzentration in absoluten Werten, rechte Ordinate: Antikörpertiter in % der Normalreaktion,

Die Glucosetoleranz (G.T.) wurde von Frau Dr. Dr. Herberg aus unserem Institut untersucht. Die erste Bestimmung erfolgte innerhalb der Immunisationsperiode 10 Tage nach der letzten Immunisation, zu einem Zeitpunkt als alle direkt auf den Glucosemetabolismus einwirkenden Substanzen bereits abgebaut sein sollten und nur noch Antikörper wirksam bleiben konnten. Eine zweite G.T.-Bestimmung wurde am Ende der Testperiode, kurz vor der histologischen Untersuchung durchgeführt, um einen engen zeitlichen Zusammenhang zu den histologischen Befunden zu erhalten.

II. MATERIAL UND METHODEN

a) Insulin

Zwei verschiedene Insulinchargen - ein nur einmal kristallisiertes Schweineinsulin (Charge Ci-J-MS-3) und ein MC-Schweine-Insulin (Charge MC-S-270 Ac) wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. SCHLICHTKRULL, Novo Research Center, Kopenhagen, zur Verfügung gestellt. Entsprechend den Arbeiten von SCHLICHTKRULL et al. (1969 und 1972) enthält das einmal kristallisierte Insulin etwa 20 % an Proteinen, die zwar mit Insulin zum großen Teil verwandt sind, sich aber von dem wahren Sangerinsulin unterscheiden. Die Hälfte dieser kontaminierenden Proteine hat ungefähr das gleiche Molekulargewicht wie Insulin von etwa 6 000, die andere Hälfte dagegen ein höheres. Die Trennung nach dem Molekulargewicht erfolgte durch Gelchromatographie über Sephadex G-50 (Abb. 3). In der höhermolekularen Fraktion fanden sich: intermediäres Insulin, Proinsulin, dimeres Insulin und noch nicht identifizierte höhermolekulare Insuline, möglicherweise oligomeres, polymeres, aggregiertes Insulin oder Insulin als Hapten. Die Fraktionierung der Proteine mit etwa gleichem Molekulargewicht wie Insulin war durch Chromatographie über Ionenaustauscher erreicht worden und trennte Arginin-Insulin, Desamido-Insulin und andere modifizierte Insuline von MC-Insulin (Monokomponent-Insulin)

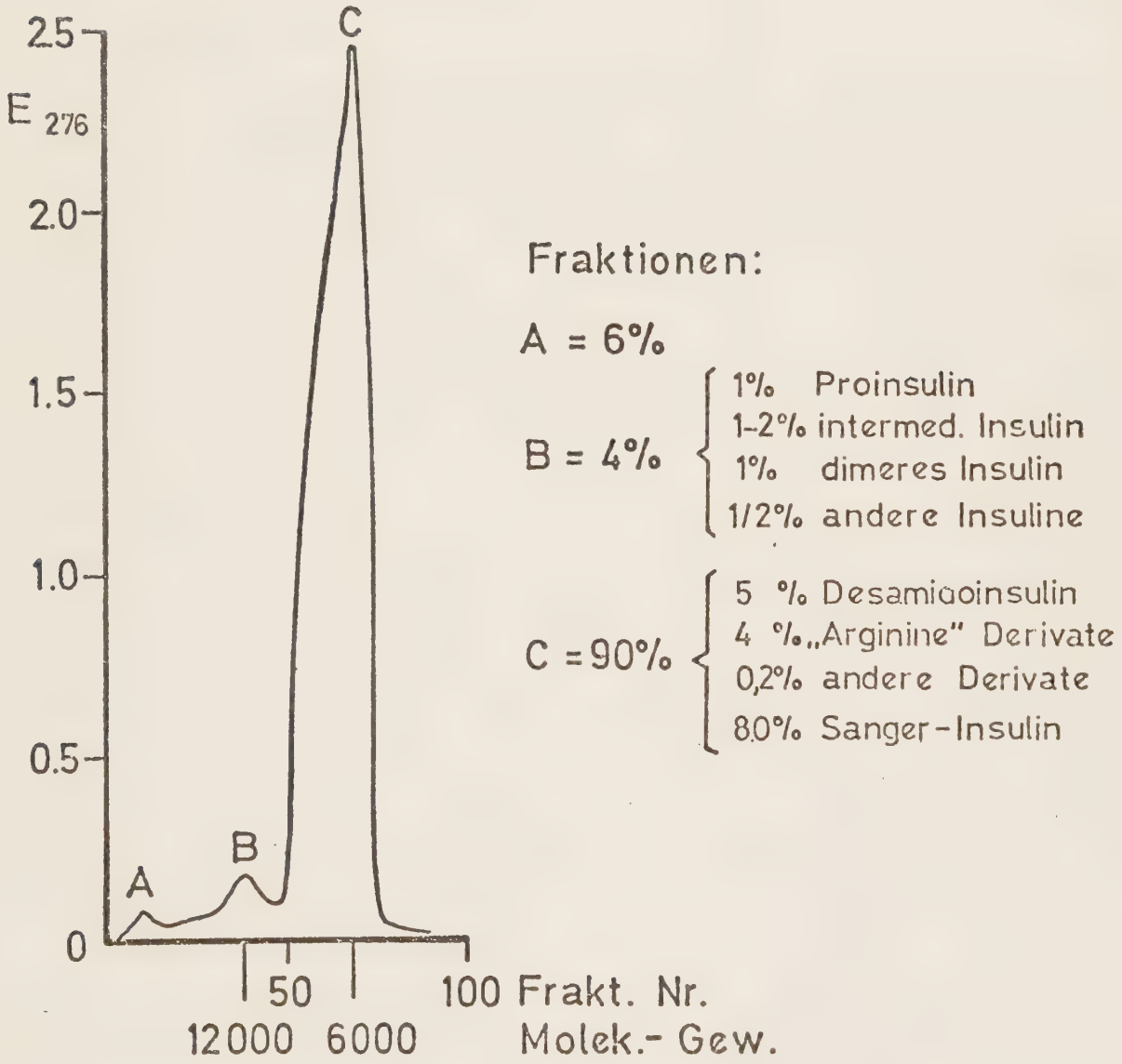


Abb.: 3

Reinigung von 1 mal krist. Insulin auf einer G-50 Sephadex-säule. Die höhermolekularen Bestandteile werden zuerst eluiert und erscheinen in den Gipfeln A und B, während C hauptsächlich Sanger-Insulin und einige seiner Derivate enthält. (Nach J.SCHLICHTKRULL et al. 1969)

ab. Das 1 x krist. Insulin ergab nach SCHLICHTKRULL et al. (1969) in der Polyacrylamidelektrophorese mehrere Banden (Abb. 4), während die MC-Insulincharge nur eine Bande erzeugte (Abb. 5).

b) Versuchstiere

Für die Vorversuche wurden CBA-Mäuse von Bar Habor und dank der freundlichen Vermittlung von Dr. MITCHISON, CBA-Mäuse aus dem National Institute of Medical Research, London, sowie C57BL-Mäuse von Bar Habor und NMRI-Mäuse aus einer Koloniezucht von einem hiesigen Züchter verwandt. Der Hauptversuch erfolgte mit 530 weiblichen NMRI-Mäusen mit einem Gewicht von etwa 30 g. Die Tiere wurden in Gruppen von je 10 Tieren randomisiert und unter Altromin-Standarddiät gehalten.

c) Immunisation

Die höchste Insulindosis, die NMRI-Mäuse trotz ihrer Toxizität intraperitoneal vertragen konnten, betrug 100 µg, wenn die Tiere etwa 1 Stunde nach der Insulininjektion s.c. 2 ml 20 % Glucose erhielten und ständig genügend Futter zur Verfügung hatten. 10 µg/Maus erforderten ebenfalls noch eine Glucoseinjektion, während 1 µg/Maus (= 27 mE) auch ohne Glucose nicht mehr zu Schocksymptomen führte. Erfolgte die Glucoseinjektion besonders bei der höchsten Dosis zu früh oder zu spät, so wurden Tiere im Schock verloren. Höhere Dosen, wie 1 mg Insulin führten auch bei mehreren Glucosegaben zu einem hohen Tierverlust, so daß sie für den Toleranzversuch nicht eingeplant werden konnten. Nach 100 µg Insulin/Maus waren die Tiere auffallend ruhig, zeigten aber keine Konvulsionen.

Die beiden Insulinchargen waren mit einigen Tropfen verdünnter Ammoniaklösung aufgelöst und in 0,04 M Phosphatpuffer pH 7,8 auf die Konzentration von 200 µg/ml gebracht worden. Der Puffer enthielt 1 % isologes Serum, um eine Adsorption von Insulin an die Gefäßwände zu verhindern. Vor dem Beginn des Experiments wurden von einer Insulinkonzentration von 200 µg/ml

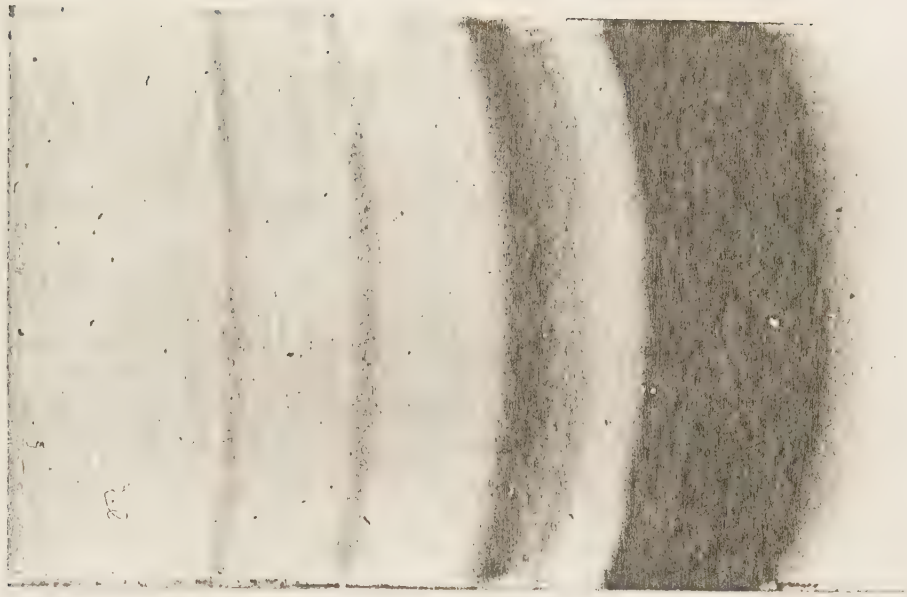


Abb.: 4

Polyacrylamidelektrophorese von 1 mal kristallisiertem Insulin mit mehreren Banden von Insulinabkömmlingen oder kontaminierenden Proteinen (aus: SCHLICHTKRULL et al. 1969 mit freundlicher Genehmigung des Autors)

Abb.: 5

Polyacrylamidelektrophorese von MC-Insulin mit nur einer Bande (aus SCHLICHTKRULL et al. 1969 mit freundlicher Genehmigung des Autors)

ausgehend fünf 1 : 10 Verdünnungen in ausreichendem Volumen angesetzt und bei -20 C° aufbewahrt. Die Immunisationen erfolgten an Gruppen zu je 10 Mäusen mit 6 verschiedenen Dosen von 100 µg, 10 µg, 1 µg, 100 ng, 10 ng und 1 ng pro Maus, die in 0,5 ml Phosphatpuffer pH 7,8 enthalten waren. Die Kontrollgruppen erhielten nur Pufferinjektionen mit 1 % isologem Serum. Die Immunisationen wurden 3 mal pro Woche bei den Gruppen A einen halben Monat, bei den Gruppen B einen Monat, bei den Gruppen C zwei Monate und bei den Gruppen D drei Monate lang durchgeführt. 11 Tage nach der letzten Injektion wurden Blutproben an der Orbita entnommen, um den Antikörpergehalt am Ende der Immunisationsperiode ohne Adjuvans zu bestimmen. Zwei Tage später erhielten alle Tiere, die Kontrollen eingeschlossen, die einmalige Testimmunisation von 100 µg 1 x krist. Insulin in komplettem Freundschen Adjuvans an 4 Stellen in die Bauchhaut (1 Volumen kompl. Freundsches Adjuvans wurde mit 1 Volumen inkompl. Adjuvans gemischt). Daran anschließend wurden nach 3 Wochen, 5 Wochen und 7 Wochen Blutproben zur Antikörperbestimmung abgenommen und pro Tiergruppe gemischt, um die Anzahl der Antikörperbestimmungen zu verringern. Dagegen wurden zu dem Zeitpunkt, als die positiven Kontrollen bereits das Plateau der Antikörperantwort erreicht hatten, etwa 10 Wochen nach der Testimmunisation, individuelle Proben abgenommen und individuell untersucht. 0,1 ml Blut, aus der Orbita entnommen, wurde in Phosphatpuffer mit 0,5 % EDTA, pH 7,2 bei gemischtem Blut auf 1/20 und bei den Individualproben auf 1/50 verdünnt. Alle Proben wurden zentrifugiert und nach dem Verwerfen des Erythrozytensediments bei - 20 C° bis zur Antikörperbestimmung aufbewahrt. Die Verdünnungen wurden auf unverdünntes Gesamtblut und nicht auf unverdünntes Serum bezogen.

d) Antikörperbestimmung

Die Konzentration der Insulinantikörper erfolgte nach der Methode von MELANI et al. (1965) mit radioaktivem ^{125}Jod-Insulin der Firma Höchst, welche auf die Methode von MEADE und

KLITGAARD (1962) zurückgeht.

Amberlite CG 400 I stammte von der Firma Serva, Heidelberg. Das Prinzip der Methode ist in Abb. 6 wiedergegeben. Radioaktives Insulin wird von Amberlite, den man der Lösung zufügt, theoretisch vollständig gebunden, so daß der Überstand kaum noch Radioaktivität enthält. Wenn dagegen Antikörper anwesend sind, verhindern sie die Bindung des Insulins an Amberlite und die Radioaktivität bleibt entsprechend der Konzentration der Antikörper teilweise oder ganz im Überstand zurück. Wir benutzten Amberlite in der Phosphatform bei pH 7,4, bei dem radioaktives Insulin nur teilweise, d.h. zu 75 - 80 % an Amberlite gebunden wurde, so daß, abhängig von der jeweiligen Insulincharge, 20 % oder mehr im Überstand verblieben. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um ein durch die Jodierung denaturiertes Insulin. Es stellt die Minimumkontrolle der Radioaktivität im Überstand dar. Die maximale Radioaktivität im Überstand bei Antikörperexzess betrug 95-99 % der Gesamtradioaktivität. Die Minimumkontrolle war bei Anwesenheit des Mäusenormalserums vor der Immunisation etwas höher. Zwischen den Werten für Normalserum und Maximumkontrolle konnte Antikörperkonzentrationen gemessen und austitriert werden.

Durchführung:
Zwei Verdünnungen der Blutproben, 1 : 20 und 1 : 40, wurden auf Insulinantikörper untersucht, jede von ihnen in Dreifachbestimmungen. 1 ml der jeweiligen Verdünnung wurde mit 1 ml radioaktivem Insulin von 3 µE (etwa 111 pg) 18 Stunden bei 4° inkubiert. 300 mg Amberlite wurden hinzugegeben, 30 Minuten bei 4° gehalten, intensiv gemischt und dann abzentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes wurden in einem γ-Counter von Packard gezählt. Da anfangs nur ein ß-Counter der Firma Packard zur Verfügung stand, wurden 0,5 ml des Überstandes mit 0,2 ml Digestin von Merck 30 Minuten bei 60° inkubiert und die Radioaktivität nach Zugabe von 12 ml Szintillationsgemisch 5 Minuten pro Röhrchen gemessen. Die Gesamtaktivität pro Röhrchen lag bei etwa 10 000 Counts pro Minute. Die Durchschnittswerte der

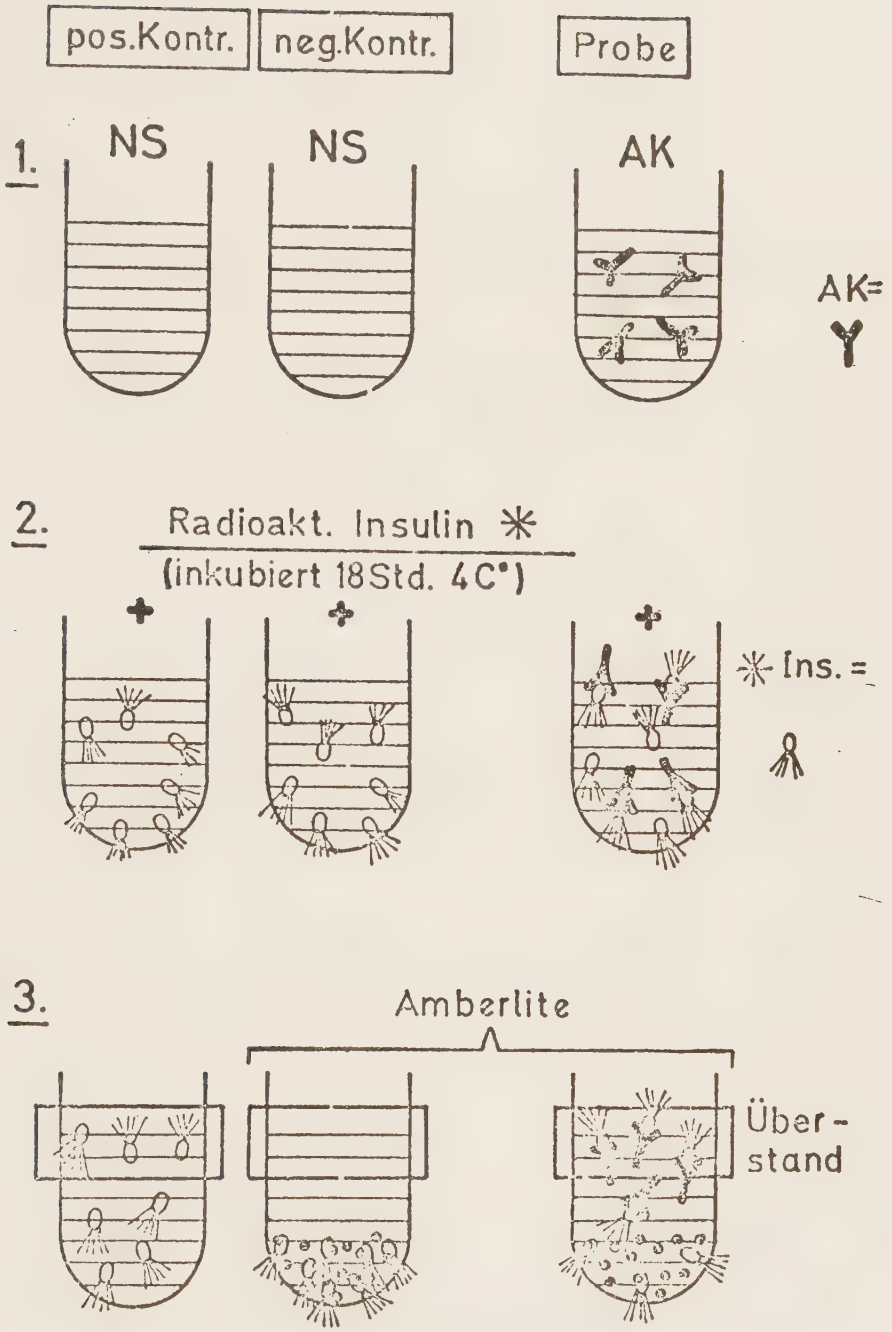


Abb.: 6

Schema der Amberlite-Methode zur Bestimmung von Insulinantikörpern. Zu den Antikörpern und zwei Normalseren als Kontrolle (1.Schritt) wird radioaktives Insulin gegeben (2.Schritt). Nur die Proben mit Antikörpern und die negative Kontrolle erhalten Amberlite (3.Schritt). Die positive Kontrolle gibt die Gesamtmenge an radioaktivem Insulin an. Die Radioaktivität im Überstand aller Proben wird in einem Gamma-Probenwechsler gemessen.

Dreifachproben wurden von % CPM in % Antikörperaktivität umgerechnet, indem die Radioaktivität der Normalserumkontrolle gleich 0, diejenige der Maximumkontrolle gleich 100 gesetzt und experimentelle Werte als Prozentsätze dieser Skala gemäß folgender Formel ausgerechnet wurden:

$$\% \text{ Antikörperaktivität} = \frac{(x - \text{Norm.Ser.Kontr.})}{(\text{Maxim.Kontr.-NS Kontr.})} \times 100$$

Die Antikörpertiter wurden als Bindungskapazität von 1 ml unverdünntem Blut für 50% des radioaktiven Insulins berechnet. Im allgemeinen wurden die ABC-50%-Werte aus den 1/40 Verdünnungen der Blutproben ermittelt. Entsprechend MITCHISON (1968) konnte die Antigen-Bindungs-Kapazität (ABC bei 50 % Insulinbindung) für jedes Einzelserum oder Mischserum mit Hilfe einer Standardverdünnungskurve aus hochtitrigen Mäuseseren ermittelt werden (Abb. 7). Die Standardverdünnungskurve wurde aus den 1 : 2 Verdünnungen von Mischseren der folgenden Tiergruppen mit den höchsten Antikörpertitern gewonnen:

1. positive Kontrollgruppe nach Testimmunisation
2. Gruppe der vorübergehenden Antikörperstimulationszone nach 14 Tagen Immunisation plus Testimmunisation
3. Gruppe der kontinuierlichen Antikörperstimulationszone nach 3 Monaten Immunisation plus Testimmunisation.

Wenn diese Kurven an dem Punkt der 50 % Bindung einander überlagert wurden, deckten sie sich weitgehend (Abb. 7). Das Insulinbindungsvermögen der Antikörper an dem Punkt der Bindung von genau 50 % des angebotenen Insulins errechnet sich aus der Menge des gebundenen Insulins multipliziert mit der Verdünnung des Blutes an diesem Punkt. Werte der Experimentaltiere, die höher oder niedriger ausfallen als der 50 % Insulinbindung entspricht, werden durch Vergleich mit der Standardkurve und mit Hilfe des auf der Abszisse eingetragenen Korrektionsfaktors nach folgender Formel errechnet:

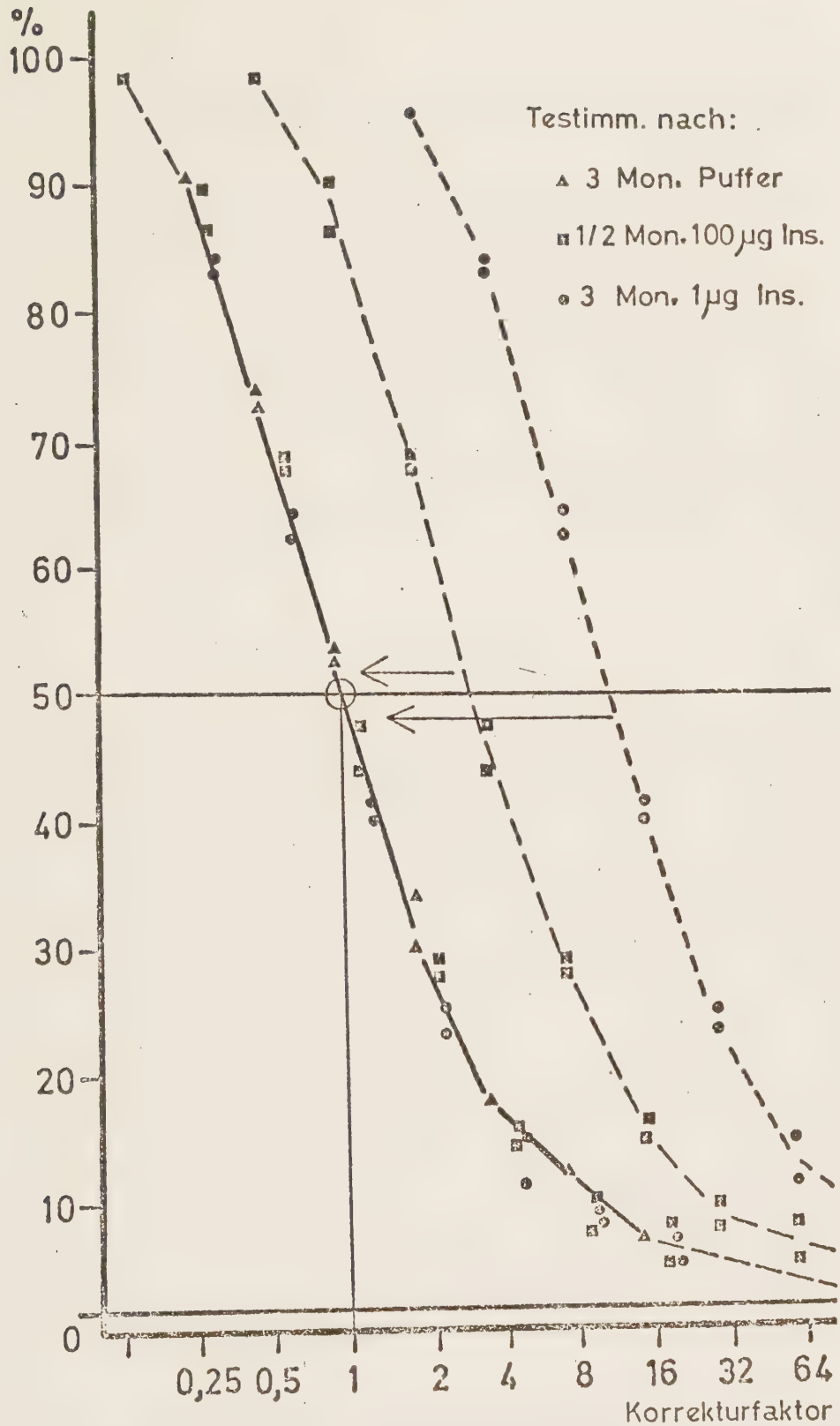


Abb.: 7

Verdünnungskurven von drei hochtitrigen Mäuseantiseren mit unterschiedlichem Antikörpertiter und nach verschieden langen Immunisationszeiten. Zum Beweis ihres fast parallelen Verlaufs sind auf der linken Kurve die Punkte der beiden rechten Kurven nach deren Parallelverschiebung mitaufgetragen. Die Titer werden jeweils an dem Schnittpunkt mit der 50%-Bindung ermittelt.

$$ABC_{50\%} = 50\%\ ^{125}J\text{-Insulin ng/ml} \times \frac{\text{Verdünnung}}{\text{Korrektionsfaktor}}$$

Aus den Individualwerten wurden die geometrischen Mittelwerte für die einzelnen Tiergruppen ermittelt.

Die experimentellen Gruppen wurden in Anlehnung an MITCHISON (1964) mit den positiven Kontrollen verglichen. Da diese während der Immunisationsperiode nur Puffer, anschließend aber Insulin in Adjuvans erhielten, wurde ihre Antikörperproduktion als Norm für nicht vorbehandelte Mäuse angesehen und gleich 100 % gesetzt. Mit diesem Wert wurden alle experimentellen Werte verglichen.

e) Isoimmundiagramm - Berechnung

Die Vielfalt der experimentellen Werte wurde wie bei MITCHISON in einem Isoimmundiagramm zusammengefaßt, in welchem Punkte gleicher immunologischer Reaktion durch Linien verbunden sind. Aus den Prozentwerten der Immunreaktion und den zugehörigen Zeit- und Dosiskoordinaten kann die Oberfläche eines dreidimensionalen Immunmodells berechnet werden. Die eine Koordinate der Grundfläche entspricht der Dauer der Immunisationen in Wochen, die andere den Dosen. Als Ordinate ist die Immunreaktion in Prozenten der positiven Kontrollen dargestellt. Die Berechnung des Isoimmundiagramms wurde freundlicherweise von Herrn Dr. KRAUTH aus dem Institut für Statistik und Dokumentation (Direktor Prof. Dr. KLINGER) in Anlehnung an MITCHISON (1968) geplant und von Herrn SZYMANSKI aus dem Rechenzentrum der Universität Düsseldorf durchgeführt und maschinell aufgezeichnet.

Für die Berechnung des Immunmodells wurden die Logarithmen der Dosis, der Zeit und der Werte der Immunreaktion verwandt. Die Werte der Immunreaktion waren ihrerseits als Prozentwerte der positiven Kontrollen ausgedrückt worden. Bei dem ersten Schritt der Berechnung wurden die Logarithmen der Werte der Immunreaktion (y) für die 6 verschiedenen Dosen (D) jeder der

vier Immunisationszeiten (Zeit = konstant) durch Polynome 4. Grades angeglichen und die sich daraus ergebenden 5 Konstanten a, b, c, d und e für jedes Polynom errechnet. Es ergaben sich für die 4 Polynome der Immunisationszeiten jeweils 5 Konstanten, die wie folgt bezeichnet wurden:

für 2 Wochen Immunisation a_1, b_1, c_1, d_1 und e_1,
für 4 Wochen Immunisation a_2, b_2, c_2, d_2 und e_2,
für 8 Wochen Immunisation a_3, b_3, c_3, d_3 und e_3 und
für 12 Wochen Immunisation a_4, b_4, c_4, d_4 und e_4.

Zusätzlich wurde eine für alle Experimentaltiere gleiche Ausgangslage zu Beginn des Experimentes postuliert, die den positiven Kontrollen entsprechen sollte, d.h. zum Zeitpunkt 1/8 Woche soll ein Polynom mit der Konstante a = log 100 und b, c, d und e = 0 angenommen werden.

In dem zweiten Berechnungsschritt wurden die von der Zeit abhängigen Koeffizienten der im ersten Schritt berechneten Polynome durch Polynome 3. Grades errechnet, und zwar jeweils getrennt die absoluten Glieder a_1, a_2, a_3 und a_4 der vier Polynome als auch für die linearen Glieder b_1, b_2, b_3 und b_4..... usw. bis zu den Gliedern e_1, e_2, e_3 und e_4. Aus diesen Polynomen 3. Grades folgten die neu errechneten Konstanten: f_1, g_1, h_1, i_1, für das Polynom über die absoluten Glieder ; f_2, g_2, h_2, i_2, für das Polynom über die linearen Glieder ; ..... bis zu f_5, g_5, h_5, i_5, für das Polynom der letzten Glieder.

Die Zielfunktion für die Oberflächenberechnung des Immunmodells wird mit diesen neuen Konstanten in folgender Weise aufgestellt:

$$
\begin{aligned}
y = {} & (f_1 + g_1T + h_1T^2 + i_1T^3) \\
& +(f_2 + g_2T + h_2T^2 + i_2T^3) D \\
& +(f_3 + g_3T + h_3T^2 + i_3T^3) D^2 \\
& +(f_4 + g_4T + h_4T^2 + i_4T^3) D^3 \\
& +(f_5 + g_5T + h_5T^2 + i_5T^3) D^4
\end{aligned}
$$

y repräsentiert den Logarithmus der prozentualen Immunreaktion und kann aus dieser Gleichung für alle vorgegebenen Zeit- und Dosiskoordinaten berechnet werden. y stellt daher die Oberfläche eines dreidimensionalen Immunmodells dar. Für die zeichnerische Darstellung wurden aber nur drei Isoimmunlinien, d.h. Höhenlinien des Immunmodells ermittelt, und zwar jene für 200 %, 50 % und 10 % der Immunreaktion normaler Tiere (= positive Kontrollen). Zu diesem Zweck wurde y = log 200, bzw. log 50 oder log 10 gesetzt. Von den Dosiswerten ausgehend konnte nun für 101 vorgegebene Dosiswerte die Nullstellenmenge des resultierenden Polynoms 3. Grades für T ausgerechnet und maschinell aufgezeichnet werden. Hieraus ergeben sich die drei Isoimmunlinien.

f) Histologische Untersuchung

Nur die Tiere der 3 Monate dauernden Immunisationsperiode wurden 5 Monate nach der Testimmunisation histologisch untersucht. Während eine Hälfte der Tiere zu diesem Zeitpunkt für die histologische Untersuchung durch Genickstrecken getötet wurde, erhielt die andere Hälfte eine zweite Testimmunisation von 100 µg 1 x krist. Insulin, um die histologischen Befunde zu intensivieren, und wurde drei Wochen später ebenfalls getötet.

Unmittelbar nach dem Tode wurde das Pankreas herauspräpariert und in Bouinscher Lösung fixiert. Teile von Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Lymphknoten wurden in 10 %-igem Formalin konserviert. Histologische Schnitte wurden in verschiedenen Schnitthöhen der in Paraffin eingebetteten Präparate angefertigt und mit Hämalaun-Eosin, Schiff'scher Base (PAS), Giemsa oder Gömöri's Aldehyd-Fuchsin angefärbt. Die histologische Untersuchung wurde von den Herren Dr. Freytag und Dr. Klöppel im Pathologischen Institut der Universität Hamburg ohne Kenntnis der Vorbehandlung durchgeführt.

g) Glucosetoleranztest

In einem Vorversuch wurden 14 Tiere 11 Tage nach der zweimonatigen Immunisationsperiode, d.h. vor der Testimmunisation mit Glucosetoleranztests (GTTs) untersucht, und zwar nach 1 x krist. Insulin 3 Tiere aus der Dosisgruppe 10 µg und 2 Tiere aus der Dosisgruppe 100 µg, nach MC-Insulin jeweils 3 Tiere aus den Gruppen 10 µg und 100 µg, sowie drei Kontrolltiere.

In einem umfangreicheren 2. Versuch wurde die Glucosetoleranz bei allen Dosisgruppen nach einmal krist. Insulin, nach MC-Insulin und bei Kontrolltieren an jeweils 5 Tieren ebenfalls 11 Tage nach der dreimonatigen Immunisationsperiode, wieder vor der Testimmunisation, durchgeführt. Eine letzte Bestimmung der Glucosetoleranz erfolgte bei der 1. Hälfte derselben Tiere 5 Monate nach der Testimmunisation und bei der reimmunisierten 2. Hälfte 7 Tage nach der zweiten Testimmunisation. Dieser Zeitpunkt lag jeweils kurz vor der histologischen Untersuchung.

Glucosetoleranztests wurden morgens um 9 Uhr durchgeführt. Vorher hatten die Tiere freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Die Glucosebelastung erfolgte mit 2,5 g Glucose pro kg Körpergewicht als eine i.p. Injektion einer 10 %-igen Glucoselösung. Blutproben wurden vor der Glucosegabe, 20 Minuten und 120 Minuten nach der Glucosebelastung am Schwanz abgenommen. Zur Glucosebestimmung wurden die Blutproben in Plastikgefäßen ohne Koagulantien aufgefangen und mit der O-Toluidine-Methode nach HOFFMAN (1967) gemessen. Die GTTs wurden von Dr. Dr. L. Herberg durchgeführt.

h) Statistische Berechnungen

Bei dem Versuch der Erzeugung einer Toleranz mit 1 mal kristallinem oder MC-Insulin wurden die Unterschiede der Antikörpertiter zwischen den Tiergruppen mit Hilfe des U-Tests von MANN und WHITNEY geprüft (E. WEBER 1967, 6. Auflage, Seite 501).

Beim Vergleich relativer Häufigkeiten innerhalb der Untersuchungen über Insulitis, Periduktulitis und Glucosetoleranz wurde der (exakte) Vierfelder-Test angewendet. (vgl. z.B.

Geigy-Tabellen : 7. Auflage, Seite 109).

Für die Korrelation der Insulinantikörper mit den histologischen Befunden wurden 4 Felder-Korrelationen berechnet.

$$V = \frac{a \cdot d - b \cdot c}{\sqrt{(a+b)\ (a+c)\ (b+d)\ (c+d)}}$$ (vgl. z.B. LIENERT 1962)

Da die histologischen Befunde nur in "+" und "-" Werte eingeteilt worden waren, wurden bei diesen Korrelationen auch die Antikörperkonzentrationen als "+", wenn 0,050 ng $ABC_{50\%}$ und mehr gemessen wurden, oder "-", wenn weniger gemessen wurde, angesehen.

III. ERGEBNISSE

a) Immunantwort verschiedener Mäusestämme

Vor dem Beginn des Versuches, eine Immuntoleranz gegenüber Insulin zu erzeugen, wurde die Immunantwort gegenüber Insulin bei mehreren Mäuselinien untersucht. CBA-Mäuse vom National Institute of Health (London) ,so wie CBA-Mäuse und C57 BL-Mäuse von Bar Harbor (USA) erzeugten keine Insulinantikörper nach einer Testimmunisation mit 100 µg Insulin in komplettem Freundschen Adjuvans. Daher waren diese Inzuchtstämme für den Toleranzversuch nicht geeignet. NMRI-Mäuse aus einer Kolonie-zucht von hiesigen Züchtern gaben dagegen nach der gleichen Dosis einen gut verwertbaren durchschnittlichen Antikörpertiter von $10^{2,92}$ pg/ml ABC 50 %. Die Standardabweichung $10^{0,78}$ pg/ml ABC 50 % war jedoch groß. Es gab Einzeltiere mit nur geringen Antikörpertitern nahe der Nachweisgrenze, andere mit 100-fach höheren Titern und ebenfalls alle Zwischenwerte. Da wir keine besseren Mäuselinien kannten, führten wir den Toleranzversuch mit diesen NMRI-Mäusen durch. Eine später durchgeführte genetische Untersuchung zeigte eine starke Abhängigkeit der Immunantwort gegenüber Insulin von Histokompatibilitätsantigenen und stellte andere Inzuchtstämme fest, welche ähnliche oder bessere durchschnittliche Antikörperantworten gegenüber Schweineinsulin aufwiesen und dem H-2 d Typ angehörten. Die

Streuung dieser Inzuchtmäuse war zwar geringer aber immer noch sehr stark ausgeprägt. Die Entwicklung der Immunantwort nach der Testimmunisation in Adjuvans wurde an gemischten Seren von je 10 Tieren 3, 5, 7 und 14 Wochen lang verfolgt (Abb. 8). Die Antikörpertiter stiegen während mehrerer Wochen langsam an bis sie nach etwa 7 Wochen ein Plateau erreicht hatten, das länger als 7 Wochen anhielt.

b) Testimmunisation nach Vorbehandlung mit krist. Insulin

1. Kontrollen

Nach der Vorimmunisation der verschiedenen Gruppen mit 1 mal kristallisiertem Insulin oder MC-Insulin und der vier Kontrollgruppen mit Puffer, hatten alle Tiere bis auf zwei negative Kontrollgruppen (1/2 Monat und 2 Monate Vorimmunisation) die gleiche Testimmunisation von Insulin in komplettem Freundschen Adjuvans erhalten. Diesen negativen Kontrollgruppen war statt Insulin Puffer mit komplettem Freundschen Adjuvans gegeben worden. Den drei positiven Kontrollgruppen war bei der Testimmunisation Insulin mit komplettem Freundschen Adjuvans gegeben worden (1 Monat und 3 Monate Vorimmunisation mit Puffer und eine weitere Gruppe ohne Vorbehandlung mit Puffer). Diese positiven Kontrollen zeigten die normale Immunantwort an, wie sie bei nicht vorbehandelten Tieren zu erwarten gewesen wäre. Durch ein Verschütten von Einzelabnahmen nach 1/2 und 3 Monaten Vorimmunisation konnte von den entsprechenden Kontrollen kein geometrischer Mittelwert errechnet werden. Es blieben Einzelabnahmen der negativen Kontrollen nach 2 Monaten Vorimmunisation und der positiven Kontrollen nach 1 Monat Vorimmunisation sowie die positive Kontrollgruppe ohne Puffervorbehandlung übrig. Bei den beiden positiven Kontrollgruppen waren wegen der hohen Insulindosis von 100 µg/Tier während der Testimmunisation trotz der kurz danach applizierten Glucose mehrere Tiere verloren worden, so daß in der Gruppe mit Puffervorbehandlung 5 und in jener ohne Puffervorbehandlung 7 Tiere überlebten. Da sich beide Gruppen in ihrem geometrischen Mittel kaum von einander unterschieden, ($10^{2,902}$ pg/ml in der einen und $10^{2,932}$ pg/ml

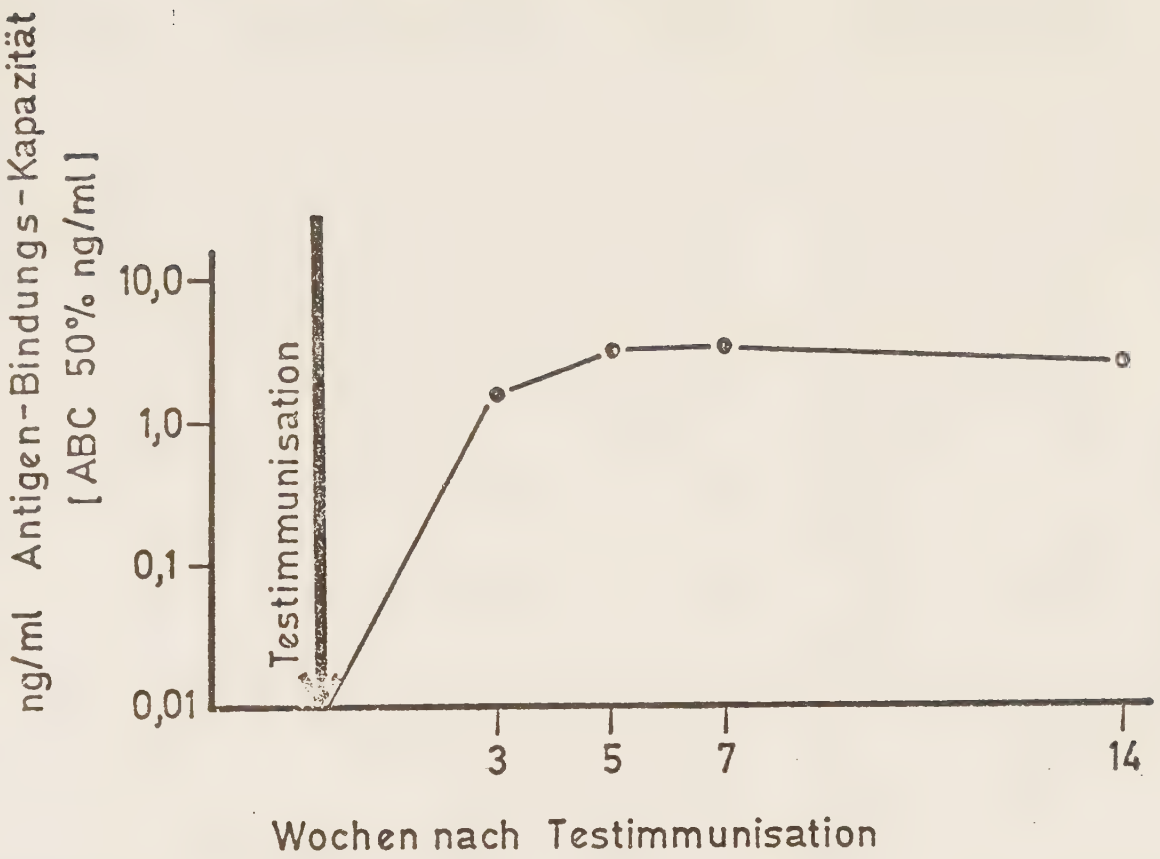


Abb.: 8

Entwicklung von Insulinantikörpern bei vorher unbehandelten Tieren nach einer Testimmunisation mit der Höchstdosis von Insulin (100 µg pro Maus) in komplettem Freundschen Adjuvans. Der Antikörpertiter, ausgedrückt in ng/ml Antigen-Bindungskapazität an dem Punkt der Bindung von 50% des gesamten radioaktiven Insulins, steigt im Laufe mehrerer Wochen an, bis er ein Plateau erreicht.

in der anderen) wurden beide Gruppen zu einer Kontrollgruppe mit 12 Tieren zusammengefaßt. Die durchschnittlichen Antikörpertiter (M) und deren Standardabweichung (σ) ergaben folgende Werte:

$$M = 10^{2,918} \text{ pg/ml ABC 50 \%}$$
$$\sigma = 10^{0,78} \text{ pg/ml ABC 50 \%}$$

2. Experimentalgruppen (Einzelseren)

Da bei den Gruppen mit einer Immunisationsperiode von 1/2 Monat und 3 Monaten (1 x krist. und MC-Insulin) die Einzelabnahmen durch ein Unglück verschüttet worden waren, ließen sich nur für die Immunisationsperioden von 1 und 2 Monaten geometrische Mittel mit ihrer Standardabweichung berechnen.

Die mit verschiedenen Dosen immunisierten Gruppen nach einem Monat Vorimmunisation erzeugten unterschiedliche Antikörpertiter. Keine Dosisgruppe hatte mehr Antikörper als die Kontrollen (Abb. 9 oben). Die Dosisgruppe 100 ng erreichte einen ähnlichen Antikörpergehalt wie die positiven Kontrollen. Bei der Dosisgruppe 10 ng deutete sich eine Verminderung des Antikörpertiters gegenüber den Kontrollen an, die aber statistisch noch nicht signifikant war (Tabelle 1). Bei den Dosisgruppen 1 µg und 10 µg war dagegen eine auf dem Niveau von 0,02 signifikante Erniedrigung der Antikörperkonzentration gegenüber den Kontrollen feststellbar. Die höchste Dosis der Vorimmunisation 100 µg erzeugte zu diesem Zeitpunkt noch mehr Antikörper als die nächst niedrige von 10 µg, was aber statistisch nicht zu sichern war.

Nach einer Vorimmunisation von zwei Monaten zeigte sich ein ähnliches Bild wie nach einem Monat, nur waren die Unterschiede jetzt größer geworden (Abb. 9 unten). Wie schon nach der einmonatigen Vorimmunisation hatte die Dosisgruppe von 100 ng keine Verminderung sondern eher eine Erhöhung des Antikörpertiters auf mehr als 200 % im Vergleich zu den positiven Kontrollen erreicht. (Tabelle 1) Wegen der zu großen Streuung

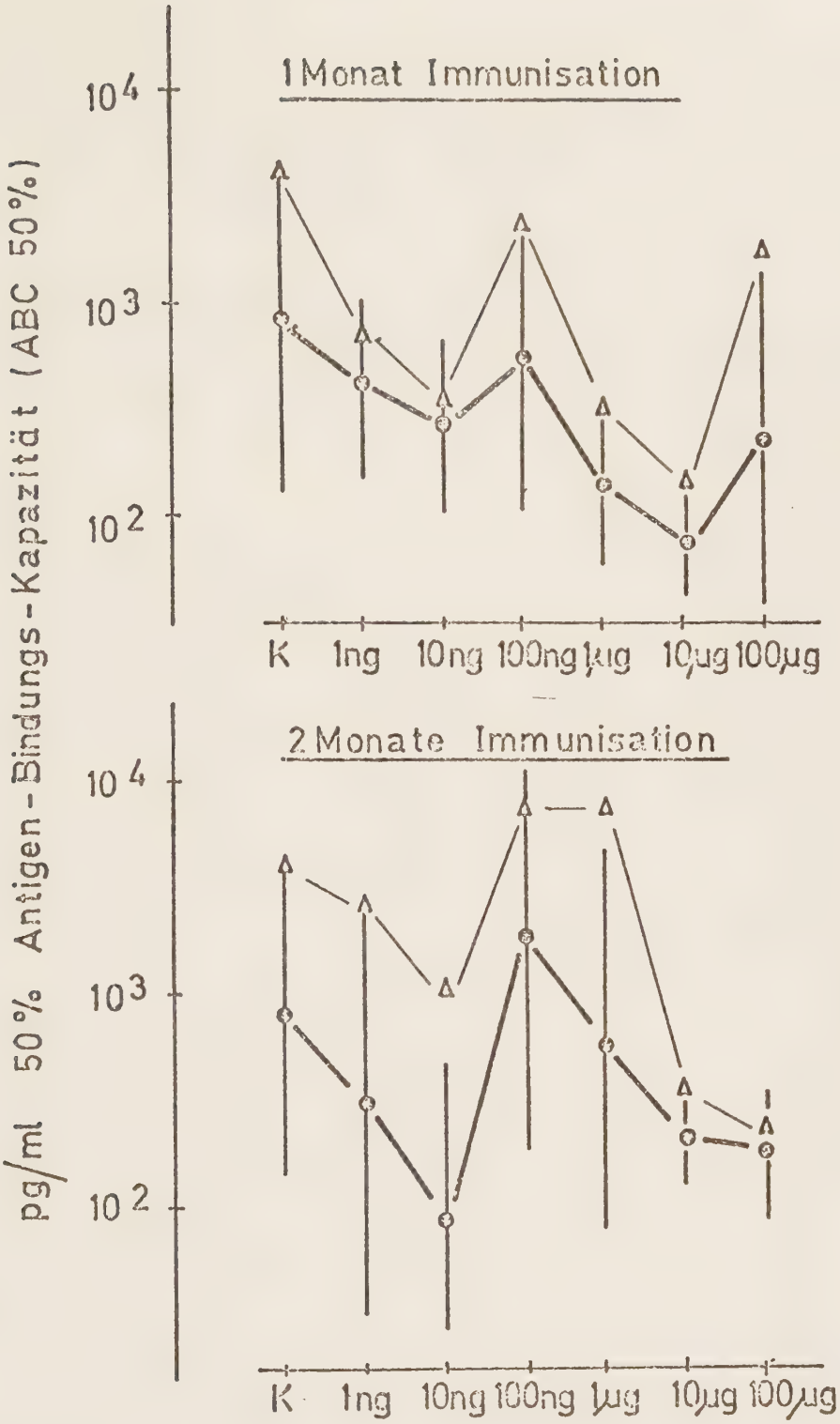


Abb.: 9

Geometrische Mittelwerte (Punkte) und Streuungen der mit 1 x krist. Insulin vorbehandelten Tiergruppen 10 Wochen nach der Testimmunisation. Die Werte der gleichzeitig abgenommenen Mischseren sind als Dreiecke dargestellt. Antikörpertiter wurden als pg/ml ABC 50% angegeben. Die Vorbehandlung mit 1 x krist. Insulin erfolgte in Gruppen mit verschiedenen Dosen (Abszisse) über einen Zeitraum von 1 Monat (obere Abb.) oder 2 Monaten (untere Abb.).

Tabelle 1

1 x krist. Insulin

Gruppe	Mittelw. log	Standard-abweichung log	Anzahl	Vergleich gegen positive Kontrollen U-Werte	Signif.
positive Kontrollen	2,919	0,781	12		
1 Monat Vorimmunisation					
1 ng	2,650	0,436	10	49	n.s.
10 ng	2,446	0,380	7	24	n.s.
100 ng	2,757	0,713	6	34	n.s.
1 µg	2,132	0,330	9	19	0,02
10 ug	1,886	0.220	7	9	0,02
100 ug	2,357	0,784	6	24	n.s.
2 Monate Vorimmunisation					
1 ng	2,510	0,982	8	38	n.s.
10 ng	1,968	0,717	10	14	0,002
100 ng	3,288	0,979	8	40	n.s.
1 µg	2,772	0,878	9	42	n.s.
10 µg	2,326	0,194	6	18	0,10
100 µg	2,292	0,257	8	22	0,05

ließ sich aber ein Unterschied zu den positiven Kontrollen statistisch nicht sichern. Eine Verminderung der Antikörpertiter im Vergleich zu den positiven Kontrollen im Sinne einer Toleranz fand sich bei niedrigen und bei hohen Dosen, d.h. bei 10 ng einerseits und bei 10 µg und 100 µg andererseits. Diese Verminderung ließ sich bei 10 ng mit 0,002 und bei 100 µg mit 0,05 statistisch sichern, während sie bei 10 µg wegen der geringen Zahl von nur 6 überlebenden Tieren an der Grenze der Signifikanz bei 0,10 lag.

3. Experimentalgruppen (Mischseren)

Um wegen des Fehlens von Einzelwerten nach 1/2 Monat und 3 Monaten doch noch einen Eindruck von dem Toleranzverhalten der immunisierten Gruppen zu erhalten, wurden auch die Mischseren dieser Gruppen ausgewertet. Sie sind jedoch nur mit großen Einschränkungen verwertbar, wie in dem folgenden Kapitel (III b 4) über das Isoimmundiagramm besprochen wird.

Die Antikörpertiter der Mischseren von Experimentalgruppen wurden mit dem Mittelwert der drei Mischseren aus den positiven Kontrollgruppen (1 Monat und 3 Monate Vorimmunisation mit Puffer und eine Gruppe ohne vorherige Pufferimmunisation) zum Zeitpunkt 7 Wochen nach der Testimmunisation verglichen, weil dann die durchschnittlichen Titer der Kontrolltiere ein Plateau erreicht hatten. Der Mittelwert aus den Titern der drei Kontrollgruppen betrug

$$10^{3,6212} \text{ ng/ml ABC 50 \%.}$$

Entsprechend dem Vorschlag von MITCHISON (1964) wurden Tiergruppen mit durchschnittlichen Antikörpertitern von mehr als 200 % der positiven Kontrollen als stimuliert, solche mit Werten zwischen 10% - 50% als schwach tolerant und solche mit weniger als 10 % als stark tolerant angesehen. (Siehe Kapitel D I b Testimmunisation).

Nach einer Immunisationsperiode von 1/2 Monat (Abb. 10, Gruppe A nach Testimmunisation) wurden bei der hohen Dosis von 100 µg hohe Antikörpertiter von mehr als 500 % der Werte der positiven

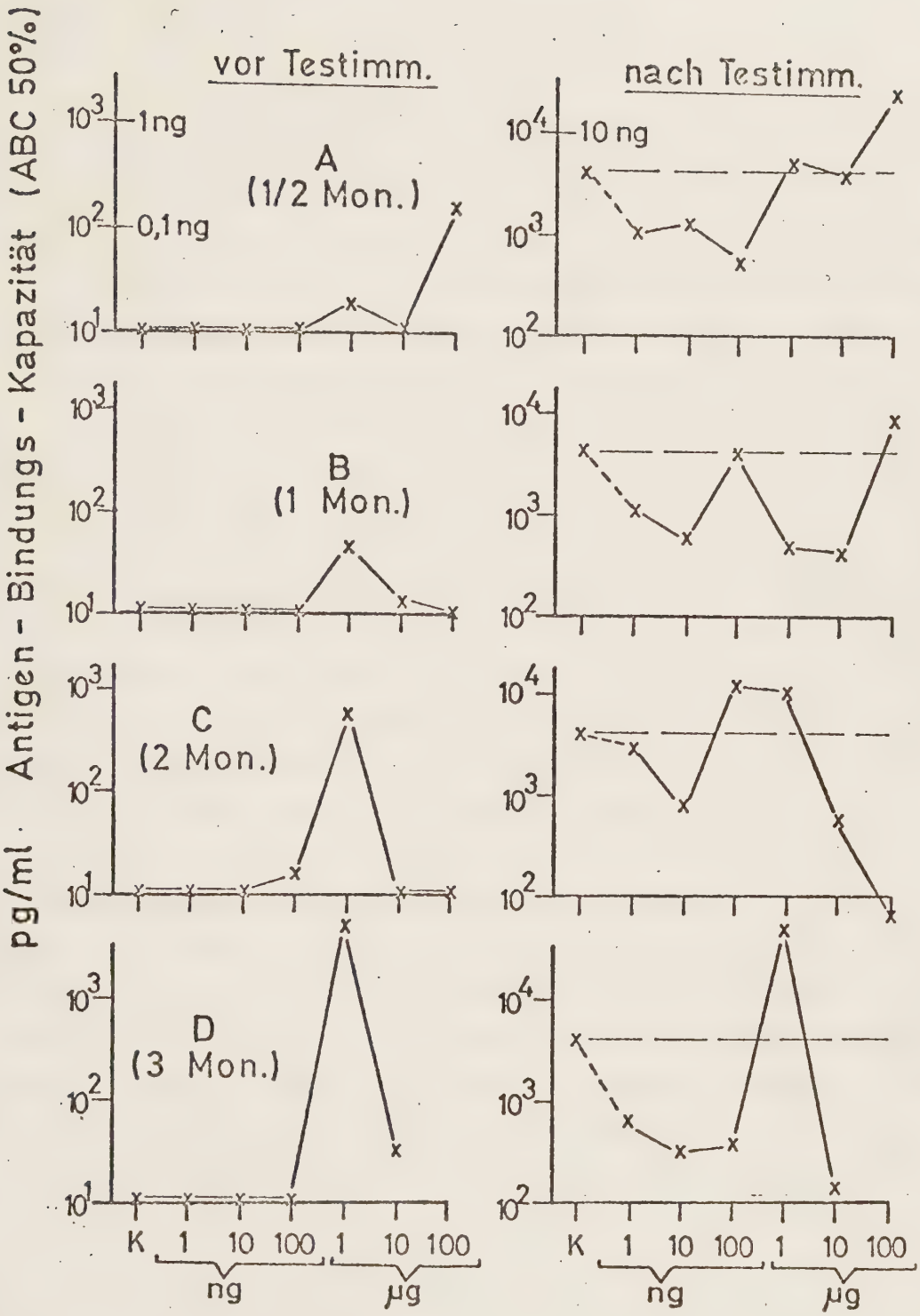


Abb.: 10

Entwicklung von Insulinantikörpern nach Immunisation mit 1 mal kristallisiertem Insulin vor der Testimmunisation (linke Seite) und nach der Testimmunisation (rechte Seite). Die untereinander liegenden Diagramme zeigen die Antikörpertiter als pg/ml ABC 50% an nach den Immunisationszeiten von 1/2 Monat (Gruppe A),1 Monat (Gruppe B), 2 Monaten (Gruppe C) und 3 Monaten (Gruppe D).

Kontrollen gefunden. Nach längeren Immunisationsperioden von 1 Monat (Gruppe B) und 2 Monaten (Gruppe C) wurden in der gleichen Dosisgruppe von 100 ug immer kleinere Antikörpertiter festgestellt. Der anfangs hohe Titer von mehr als 500 % fiel auf Werte unter 10 % des Titers der positiven Kontrollen ab, was eine starke Toleranz nach 2 Monaten Immunisation bedeuten würde. Diese Toleranz war auch bei den Einzelwerten der gleichen Immunisationsperiode festgestellt und statistisch gesichert worden (Tabelle 1). In den mittleren Dosen von 100 ng und 1 ug wurde nach den Immunisationsperioden von 1 - 3 Monaten (Gruppen B - D) ein immer größer werdender Antikörpergipfel mit Werten, die bis zu 1200 % der Werte der positiven Kontrollen ansteigen, beobachtet. Bei niedrigen Dosen von 10 ng zeigte sich dagegen mit länger dauernden Immunisationsperioden von 1 - 3 Monaten (Gruppen B - D) ein immer stärker werdender Titerabfall auf unter 7 % der Werte der positiven Kontrollen. Dies deutet, wie bei den Einzelseren besprochen, die zweite Zone von Toleranz bei niedrigen Dosen an. Auch diese Niedrigdosistoleranzzone hatte sich bei den Einzelwerten als statistisch signifikant gezeigt (Tabelle 1).

4. Isoimmundiagramm für 1 x krist. Insulin

Entsprechend dem Vorschlag von MITCHISON (1964) sollte die Vielfalt der Werte des Toleranzversuches in einem Isoimmundiagramm wiedergegeben werden, in welchem Punkte gleicher immunologischer Reaktion durch Linien miteinander verbunden wurden (Siehe D II e). Da aber bei den 1/2 und 3 Monate vorimmunisierten Tiergruppen keine Einzelabnahmen und somit keine geometrischen Mittel zur Verfügung standen, ließ sich aus den verbliebenen Gruppen nach 1 und 2 Monaten Vorimmunisation, also nur zwei Immunisationszeiten, kein Isoimmundiagramm berechnen. Eine Hinzunahme der Werte aus den Mischseren zu den Werten der Einzelabnahmen ist wegen der großen Unterschiede unmöglich. Das Isoimmundiagramm kann jedoch mit Einschränkungen aus den Mischseren allein errechnet werden.

Tabelle 2

Formel der Oberflächenberechnung des Immunmodells für 1 x krist. Insulin, 7 Wochen nach der Testimmunisation.

$$
\begin{aligned}
y = \quad & (+ 1{,}6853 - 0{,}2877\ t + 0{,}4344\ t^2 + 0{,}4016\ t^3) \\
& +(+ 1{,}2665 - 2{,}8434\ t - 2{,}0684\ t^2 + 2{,}9159\ t^3)\ d \\
& +(+ 0{,}3030 - 0{,}5657\ t - 0{,}8015\ t^2 + 0{,}2192\ t^3)\ d^2 \\
& +(- 0{,}1419 + 0{,}5247\ t + 0{,}2868\ t^2 - 0{,}5179\ t^3)\ d^3 \\
& +(- 0{,}0420 + 0{,}1482\ t + 0{,}1142\ t^2 - 0{,}1121\ t^3)\ d^4
\end{aligned}
$$

Die Formel wurde aus den Logarithmen der prozentualen Antikörperkonzentrationen für die verschiedenen Immunisationsdosen und - zeiten errechnet (siehe Tabelle 3). Bei jeder Immunisationszeit: 1/8 Woche (= normale Ausgangslage vor dem Versuch), 2 Wochen, 4 Wochen, 8 Wochen und 12 Wochen (d.h. bei konstanter Zeit) wurde für die Werte der Dosen ein Polynom 4. Grades angeglichen. Danach wurden für die Polynomkonstanten (diesmal bei konstanter Dosis) Polynome 3. Grades berechnet. Hieraus ließ sich die obige Formel zur Berechnung der Gesamtoberfläche ableiten.

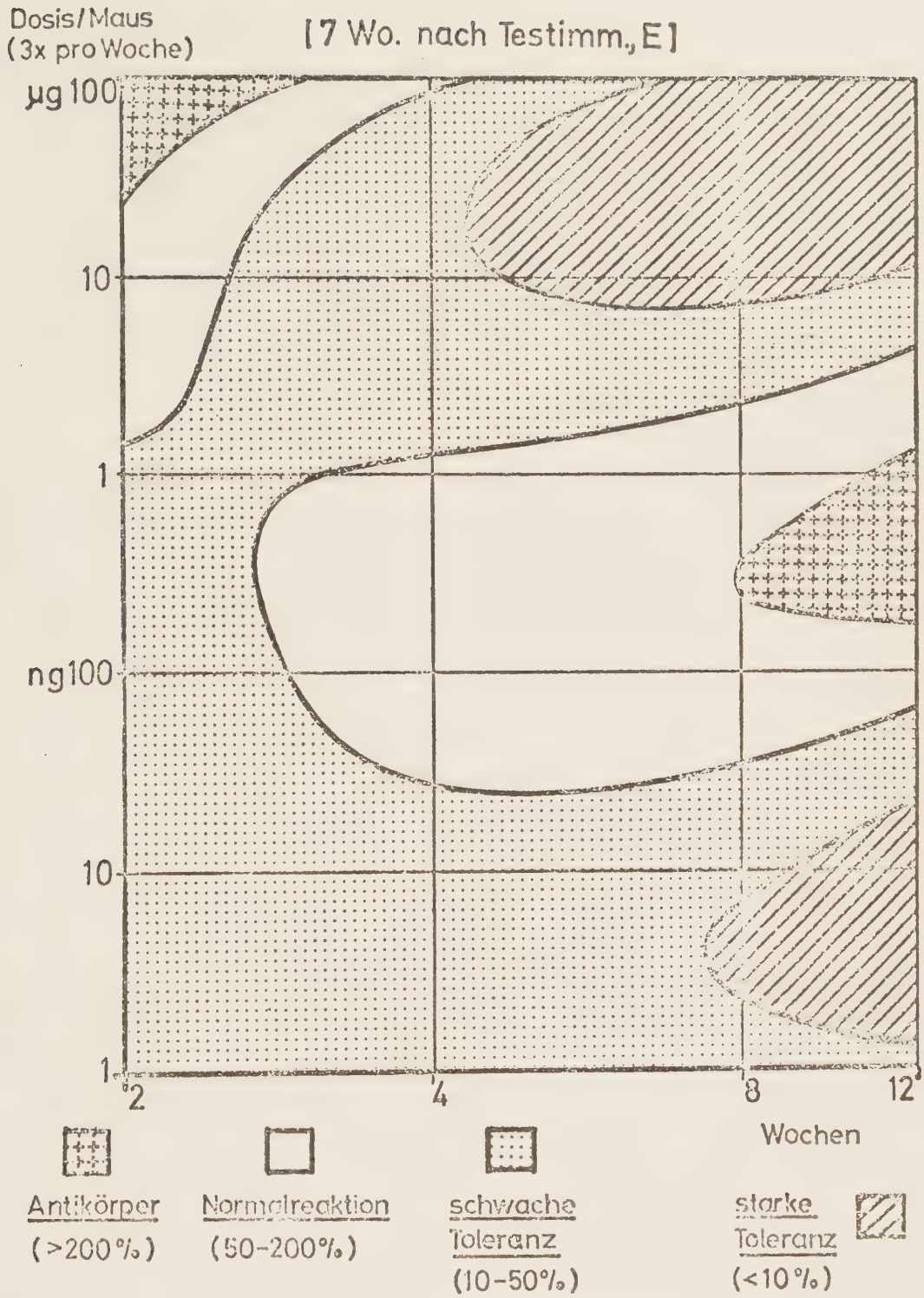


Abb.: 11

Isoimmundiagramm für 1 mal krist. Insulin zum Zeitpunkt 7 Wochen nach der Testimmunisation. Die weißen Flächen drücken eine Normalreaktion von 50-200% der Reaktion nicht vorbehandelter Mäuse aus, die Flächen mit Kreuzchen eine Stimulation der Antikörperbildung von mehr als 200%, die gepunktete Fläche eine schwache Toleranz mit einer Reaktion von nur 10 - 50% und die schräg schraffierten Flächen eine starke Toleranz von weniger als 10%.

Tabelle 3

Vergleich der experimentell gewonnenen Antikörperwerte für 1 mal krist. Insulin mit den durch die Formel berechneten Werten des Immunmodells (in Klammern) zur Beurteilung der durch die mathematische Formel entstandenen Verzerrung. Die Antikörpertiter werden als Prozentwerte der positiven Kontrollen ausgedrückt und als deren Log. wiedergegeben.

Dosis/Injekt.	Immunisationsdauer			
	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen
100 ug	2,7518 (2,9003)	2,3145 (1,8645)	0,1584 (0,7077)	——— (0,0517)
10 ug	1,9750 (2,0555)	1,0531 (1,1472)	1,1367 (0,8217)	0,5315 (1,0914)
1 ug	2,1357 (1,6490)	1,0969 (1,7572)	2,4038 (2,0756)	3,0774 (2,3855)
100 ng	1,1430 (1,3944)	1,9814 (1,9349)	2,4990 (2,1341)	0,9685 (1,9688)
10 ng	1,4829 (1,2431)	1,1430 (1,4607)	1,2718 (1,1197)	0,8704 (0,5171)
1 ng	1,4281 (1,3841)	1,4928 (1,6545)	1,8445 (1,6127)	1,1644 (1,3474)

Deshalb wurde ein Vergleich der Antikörpertiter von Mischseren mit den geometrischen Mitteln der gleichzeitig abgenommenen Einzelabnahmen bei den 1 und 2 Monate lang vorimmunisierten Tiergruppen vorgenommen (Abb. 9), welcher zeigte, daß die Titer der Mischseren zum Teil wesentlich höher lagen als die geometrischen Mittelwerte der korrespondierenden Einzelabnahmen. Dies beruhte auf einzelnen hohen Einzelwerten. Bei Seren mit niedrigen Titern dagegen, bei welchen natürlich herausfallend hohe Einzelwerte fehlen mußten, näherten sich die Titer der Mischseren weitgehend den geometrischen Mitteln der aus den Einzelwerten gewonnenen Titer an. Wenn auch die Titerverminderung bei den Mischseren im Vergleich zu den positiven Kontrollen stärker akzentuiert war als bei den Einzelseren, so war aber die Tendenz zur Toleranz dieselbe wie bei den geometrischen Mitteln. Da unsere Experimente gerade die Toleranz darstellen wollten, kann bei der Verwendung von Mischseren, die eine deutliche Tendenz zur Toleranz andeuten, kein gravierender Fehler entstehen. Umgekehrt kann aber eine mit geometrischen Mitteln aus Einzelwerten festgestellte Toleranz bei Mischseren nicht in Erscheinung treten, da ein einzelner herausfallender Wert eine Tendenz zur Toleranz verwischen kann, wie dies z.B. bei der Dosisgruppe 10 ng nach 2 Monaten Immunisationsperiode beobachtet wurde.

Das mathematisch berechnete und maschinell gezeichnete Isoimmundiagramm von kristallinem Insulin mit den Isoreaktionslinien für 200 %, 50 % und 10 % der Antikörpertiter der Kontrollen wird in Abb. 11 dargestellt. Die Formel zur Berechnung des Diagramms ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Verzerrung durch die Polynomangleichung an unsere experimentellen Werte ist gering (siehe Tabelle 3 für beobachtete und berechnete Werte). Das mathematisch berechnete Diagramm entspricht weitgehend einem früher durch Interpolation gewonnenen Übersichtsdiagramm (JANSEN 1972). Die weiße Fläche zwischen den Linien 50 % und 200 % stellt den Bereich der Normalreaktion dar. Die karierte Fläche innerhalb der 200 % Linie repräsentiert eine Stimulationszone mit mehr als 200 % Antikörper der positiven

Kontrollen. Die gepunktete Fläche zwischen den Linien für 10 % und 50 % deutet den Bereich einer schwachen und die schräg schraffierte Fläche innerhalb der 10 % Linie eine starke Toleranz an.

c) Testimmunisation nach Vorbehandlung mit MC-Insulin

1. Experimentalgruppen (Einzelwerte)

Auch nach der Vorimmunisation mit MC-Insulin wurde die Testimmunisation mit 1 x kristallisiertem Insulin durchgeführt, da dieses wesentlich immunogener und daher für die Testimmunisation geeigneter erschien als MC-Insulin. Als Kontrollen dienten die gleichen Gruppen wie bei 1 mal krist. Insulin, da die Immunisationen mit beiden Insulinchargen zur gleichen Zeit und in derselben Weise durchgeführt worden waren.

Nach einem Monat Vorimmunisation mit MC-Insulin hatten die meisten Dosisgruppen einen verminderten Antikörpertiter (Abb. 12 oben). Die höchste Dosisgruppe 100 µg ergab jedoch ähnliche Titer wie die Kontrollen und ließ sich hiervon nicht statistisch signifikant abgrenzen. Die anderen Dosisgruppen hatten geringere Antikörpertiter, die statistisch auf dem Niveau von 0,02 zu sichern waren.

Nach zwei Monaten Vorimmunisation hatte sich das Bild etwas geändert (Abb. 12 unten). Von den vorher verminderten Antikörpertitern war nur bei der Dosisgruppe 10 ng eine statistisch signifikante Verminderung geblieben (Tabelle 4). Diese Gruppe erhielt die gleiche Dosis, die auch mit 1 mal krist. Insulin nach zwei Monaten eine Niedrigdosistoleranz erzeugt hatte. Die Dosisgruppen 1 ng, 100 ng, 1 µg und 10 µg erzeugten Antikörpertiter, die denen der Kontrollen ähnlich waren und sich von diesen nicht signifikant unterscheiden ließen. Die Dosisgruppe 100 µg hatte die höchste Antikörperkonzentration aller Gruppen von mehr als 300 % der Antikörpertiter der Kontrollen. Diese Vermehrung der Antikörperproduktion ließ sich aber nicht statistisch sichern (Tabelle 4). Nach 2 Monaten Immunisation zeichnete sich daher

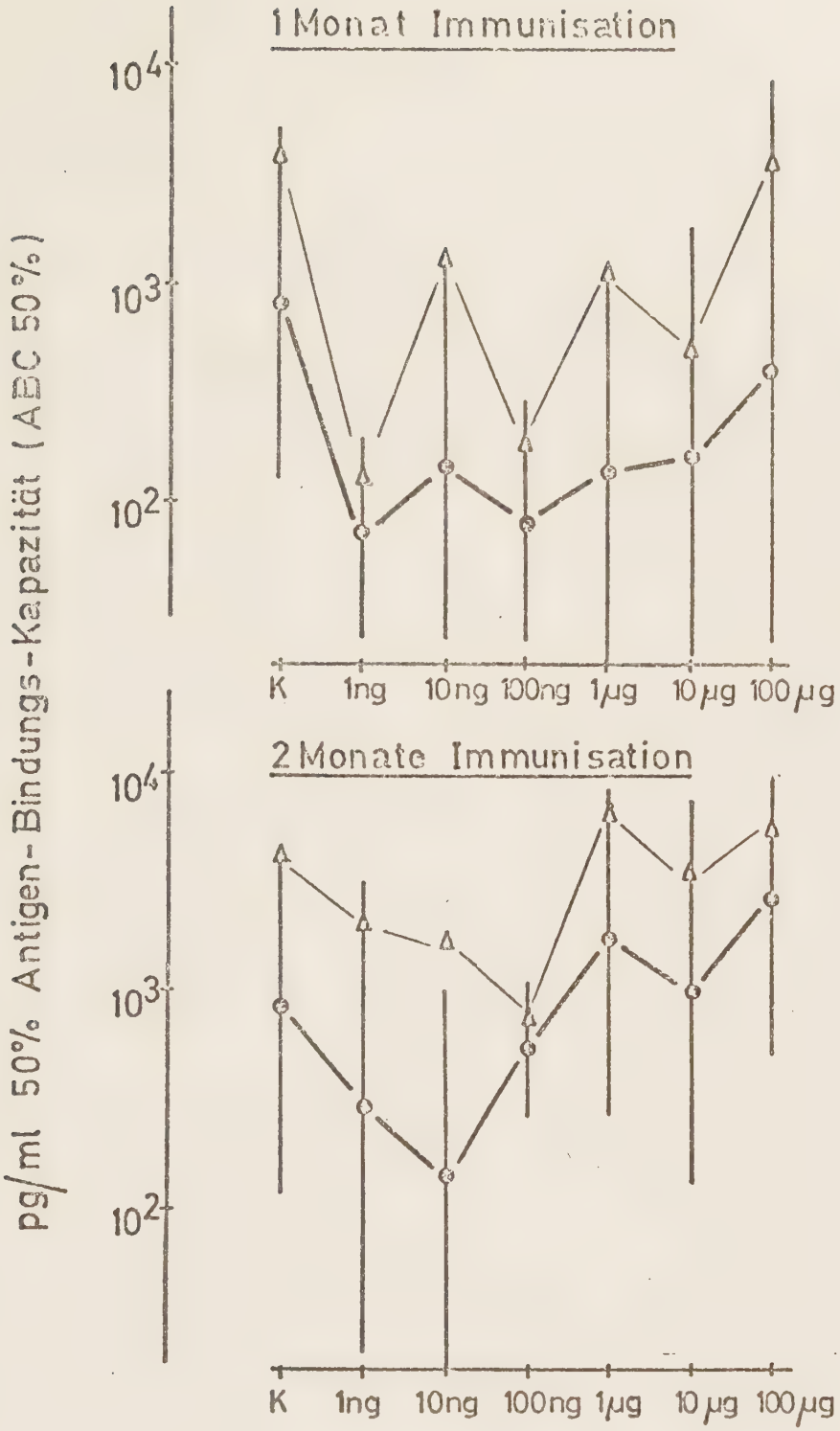


Abb.: 12

Geometrische Mittelwerte (Punkte) und Streuungen der mit MC-Insulin vorbehandelten Tiergruppen 10 Wochen nach der Testimmunisation. Die Werte der gleichzeitig abgenommenen Mischseren sind als Dreiecke dargestellt. Antikörpertiter wurden als pg/ml ABC 50% angegeben. Die Vorbehandlung mit MC-Insulin erfolgte in Gruppen mit verschiedenen Dosen (Abszisse) über einen Zeitraum von 1 Monat (obere Abb.) oder von 2 Monaten (untere Abb.).

Tabelle 4

MC-INSULIN

Gruppe	Mittelw. log.	Standard-abweichung log.	Anzahl	Vergleich mit positiven Kontr. U-Wert	Signif.
positive Kontrollen	2,919	0,781	12		
Vorimmunisation von 1 Monat					
1 ng	1,846	0,443	9	8	0,002
10 ng	2,162	0,936	9	20	0,02
100 ng	1,913	0,579	9	10	0,002
1 ug	2,158	0,915	9	20	0,02
10 ug	2,210	1,071	7	12	0,02
100 ug	2,627	1,305	5	21	n.s.
Vorimmunisation von 2 Monaten					
1 ng	2,482	1,043	10	39	n.s.
10 ng	2,145	0,886	9	21	0,02
100 ng	2,741	0,322	10	38	n.s.
1 ug	3,222	0,781	10	54	n.s.
10 ug	2,989	0,900	7	36	n.s.
100 ug	3,423	0,723	4	16,5	n.s.

in den niedrigen Dosen eine Toleranzzone ab, während bei den hohen Dosen noch keine Toleranz erkennbar war.

2. Experimentalgruppen (Mischseren)

Wie vorher erwähnt, waren die Einzelseren nach Vorbehandlung von 1/2 und 3 Monaten verschüttet worden. Daher wurden auch die Mischseren nach Vorbehandlung mit MC-Insulin ausgewertet und unter großen Vorbehalten gedeutet (siehe III b 4). Sie wurden wie bei 1 mal krist. Insulin mit den Mittelwerten der drei Mischseren aus den positiven Kontrollen (1 und 3 Monate Pufferimmunisation und eine Gruppe ohne Puffervorbehandlung) verglichen. Der Antikörpertiter der positiven Kontrollen betrug

$$10^{3,6212}\ \text{pg/ml ABC 50 \%}$$

und wurde als 100 % der Normalreaktion betrachtet.

Nach einer Immunisationsperiode von 1/2 Monat (Abb. 13, Gruppe A nach Testimmunisation) wurde bei der höchsten Dosis von 100 ug ein den Kontrollen entsprechender normaler Antikörpertiter gefunden, der auch nach längeren Immunisationsperioden von 1 - 3 Monaten (Gruppen B - D) keinen deutlichen Abfall der Titer im Sinne einer Toleranz zeigte. Dies wurde bereits bei der Auswertung der Einzelwerte nach einer 1 und 2 Monate langen Immunisationsperiode gesehen. Bei der nächst niedrigen Dosis von 10 ug scheint sich dagegen eine Hochdosistoleranz nach einer 3 monatigen Immunisationsperiode einzustellen, da sich hier ein ganz niedriger Titer von nur 0,5 % der Titer der Kontrollgruppen findet. Dieser sehr niedrige Wert eines Mischserums muß dem geometrischen Wert aus seinen Einzelwerten sehr nahe kommen und dürfte daher verwertet werden können.

Mit den Mischseren war die bei den Einzelseren statistisch gesicherte Niedrigdosistoleranz mit 10 ng MC-Insulin nach einer Immunisationsperiode von 2 Monaten nicht sichtbar geworden, da sie durch zwei herausfallende Werte überdeckt wurde.

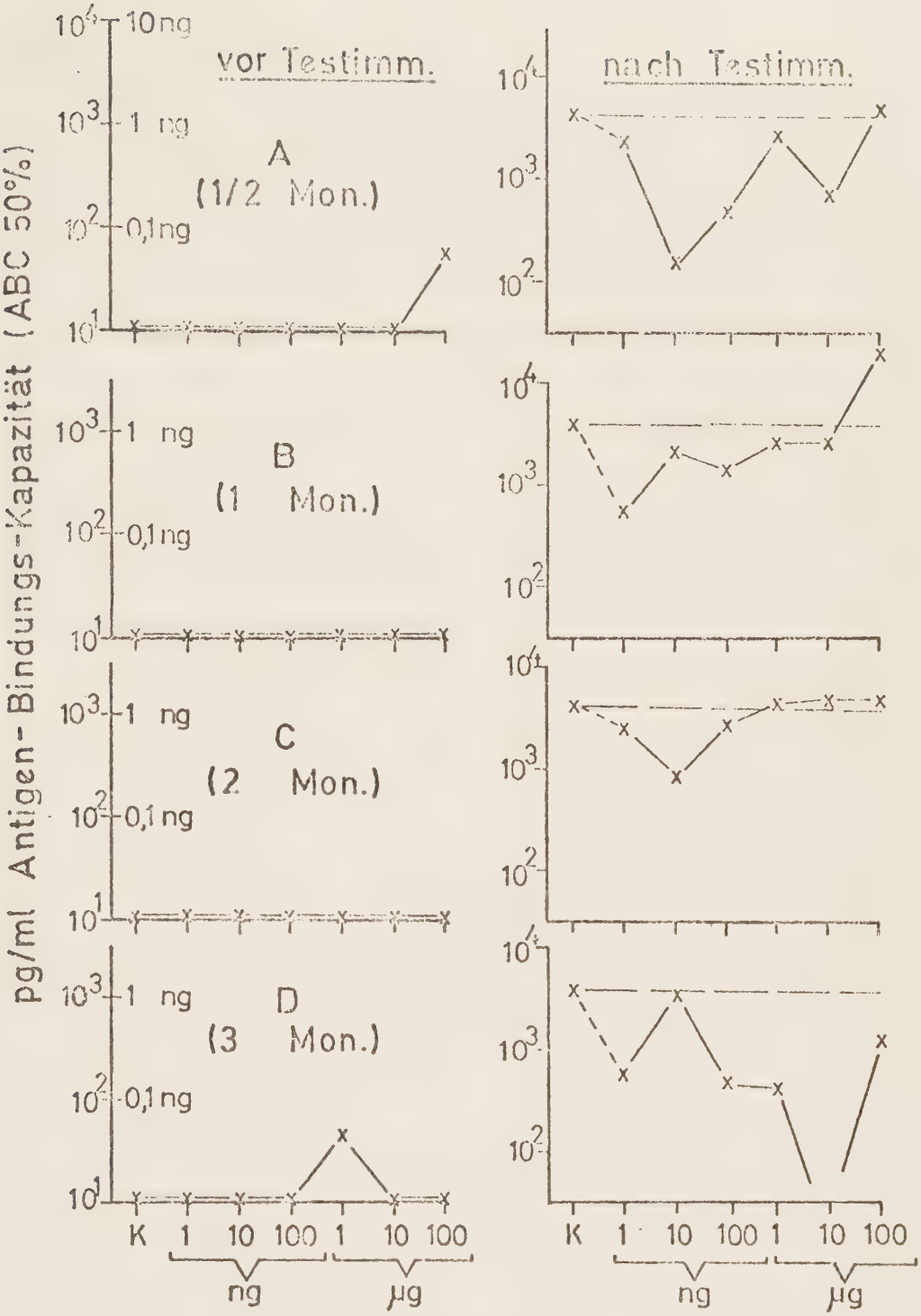


Abb.: 13

Entwicklung von Insulinantikörpern nach Immunisation mit MC-Insulin vor der Testimmunisation (linke Seite) und nach der Testimmunisation (rechte Seite). Die untereinander liegenden Diagramme geben die Antikörpertiter an als pg/ml ABC 50% nach den Immunisationszeiten von 1/2 Monat (Gruppe A), 1 Monat (Gruppe B), 2 Monaten (Gruppe C) und 3 Monaten (Gruppe D).

3. Isoimmundiagramm für MC-Insulin

Wie für 1 mal krist. Insulin besprochen, wurden auch hier für die Berechnung des Isoimmundiagramms Mischseren zu Grunde gelegt. Ein Vergleich der Titer der Mischseren nach 1 und 2 Monaten Immunisationsperiode mit den entsprechenden geometrischen Mittelwerten aus den Einzelseren zeigte auch hier, daß die Titer der Mischseren im allgemeinen höher lagen als die geometrischen Mittelwerte aus den Einzelwerten (Abb. 12). Niedrige Titer der Mischseren kamen geometrischen Mitteln dagegen sehr nahe, während hohe Titer wesentlich höher lagen. Da es bei der Erzeugung der Toleranz aber gerade auf die niedrigen Titer ankam und diese bei Mischseren sehr nahe bei den geometrischen Mitteln lagen, dürften durch die Verwendung der Mischseren unter den genannten Einschränkungen keine gravierenden Fehler entstanden sein.

Das Isoimmundiagramm wurde aus den 7 Wochen nach der Testimmunisation gewonnenen Mischseren berechnet und maschinell aufgezeichnet (Abb. 14). Die Formel wurde in Tabelle 5 wiedergegeben. Die weiße Fläche entspricht der Normalreaktion, d.h. 50 % - 200 % der Reaktion positiver Kontrollen. Die karierte Fläche bedeutet mehr als 200 % der positiven Kontrollen, die gepunktete Fläche weniger als 50 % und die schräg schraffierte Fläche weniger als 10 % der positiven Kontrollen. Die Ergebnisse der geometrischen Mittel nach 2 Monaten Vorimmunisation hatten ergeben, daß die vermehrte Produktion von Antikörpern von mehr als 200 % der positiven Kontrollen wegen der großen Streuung der Einzelwerte statistisch nicht gesichert werden konnte. Daher muß die karierte Fläche in gleicher Weise wie die weiße Fläche der Normalreaktion zugezählt werden. Die statistisch gesicherte Toleranz der geometrischen Mittel nach 4 Wochen Vorimmunisation findet sich in dem Isoimmundiagramm als partielle Toleranz bei den Dosen von 1 - 100 ng, die ebenfalls signifikante Toleranz der Dosisgruppe 10 ng nach 8 Wochen Vorimmunisation bei den Werten 1 ng - 10 ng wieder. Die mathematische Berechnung des Isoimmundiagramms und die Mischseren haben daher eine Verzerrung der Toleranzzonen zu niedrigeren Werten bewirkt. Nach

Tabelle 5

Formel der Oberflächenberechnung des Immunmodells für MC-Insulin, 7 Wochen nach der Testimmunisation:

$$
\begin{aligned}
y = {} & (+ 0{,}6580 + 2{,}6374\ t + 1{,}4085\ t^2 - 3{,}5022\ t^3) \\
& + (- 0{,}8933 + 2{,}3619\ t + 1{,}0171\ t^2 - 2{,}9868\ t^3)\ d \\
& + (- 0{,}7131 + 0{,}9003\ t + 0{,}9127\ t^2 - 1{,}0590\ t^3)\ d^2 \\
& + (+ 0{,}3217 - 0{,}5574\ t - 0{,}3561\ t^2 + 0{,}7269\ t^3)\ d^3 \\
& + (+ 0{,}1668 - 0{,}2350\ t - 0{,}2004\ t^2 + 0{,}2925\ t^3)\ d^4
\end{aligned}
$$

Die Formel wurde aus den Logarithmen der prozentualen Antikörperkonzentrationen für die verschiedenen Immunisationsdosen und -zeiten errechnet (siehe Tabelle 6).

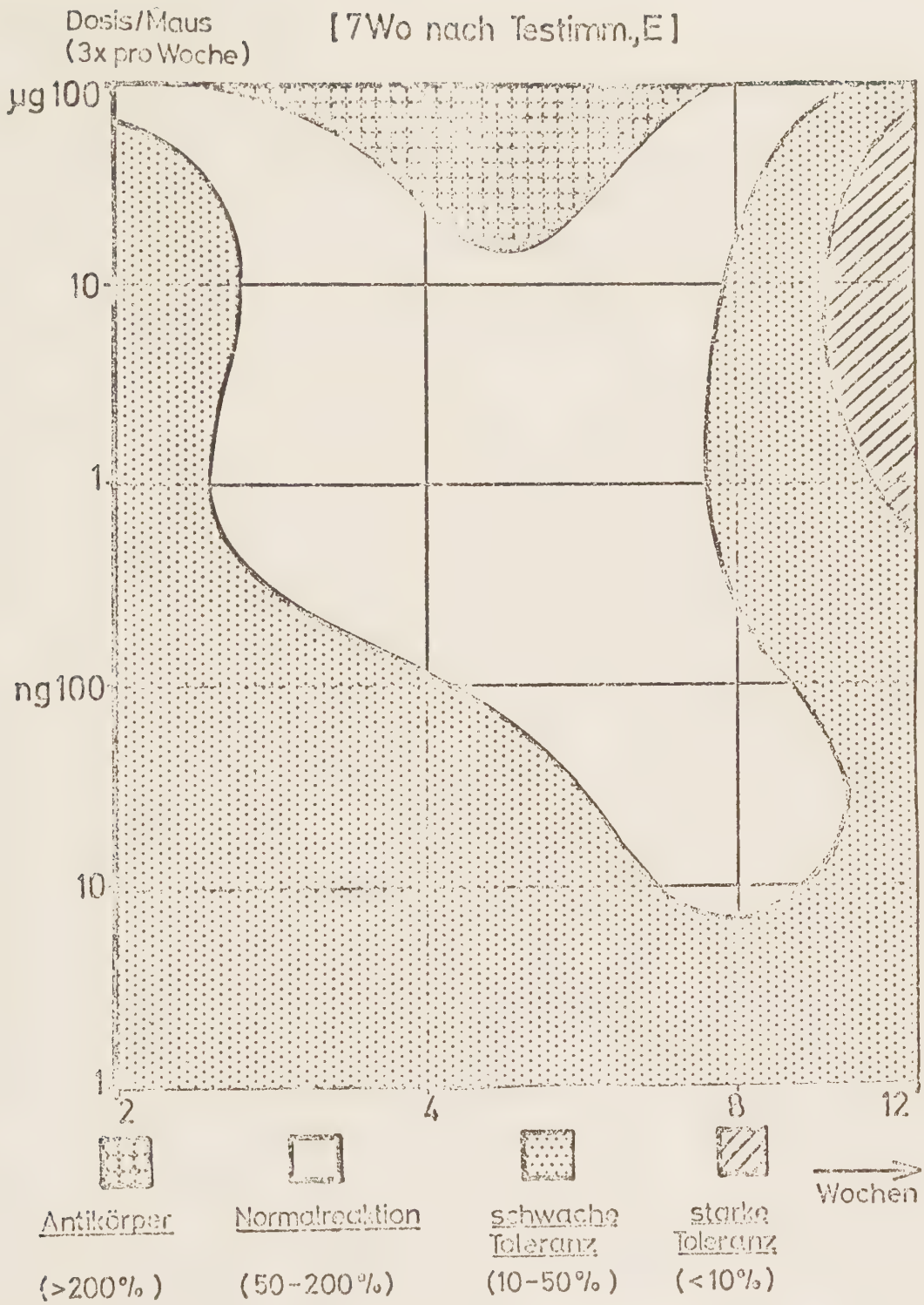


Abb.: 14

Isoimmundiagramm für MC-Insulin zum Zeitpunkt 7 Wochen nach der Testimmunisation. Die weißen Flächen drücken die Normalreaktion aus, d.h. 50-200% der Reaktion nicht vorbehandelter Mäuse, die Fläche mit Kreuzchen eine Stimulation der Antikörperbildung von mehr als 200%, die gepunktete Fläche eine schwache Toleranz zwischen 10 - 50% und die schräg schraffierte Fläche eine starke Toleranz von weniger als 10%.

Tabelle 6

Vergleich der experimentell gewonnenen Antikörperwerte für MC-Insulin mit den durch die Formel berechneten Werten des Immunmodells (in Klammern) zur Beurteilung der durch die mathematische Formel entstandenen Verzerrung. Die Antikörpertiter werden als Prozentwerte der positiven Kontrollen ausgedrückt und als deren Log. wiedergegeben.

Dosis/Injekt.	Immunisationsdauer			
	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen
100 ug	2,0645 (2,0935)	2,7295 (2,5874)	2,0755 (2,2164)	1,4914 (1,3883)
10 ug	1,2041 (1,1515)	1,7259 (2,1985)	2,0492 (1,6126)	0,3010 (0,0860)
1 ug	1,8007 (1,4840)	1,8351 (1,9921)	1,9814 (1,6091)	0,9685 (0,7429)
100 ng	1,0212 (1,2118)	1,5038 (1,6761)	1,7474 (1,7473)	1,0864 (1,4755)
10 ng	0,4771 (0,5165)	1,7931 (1,3544)	1,3304 (1,7266)	1,9128 (1,5387)
1 ng	1,7619 (1,6409)	1,1492 (1,5276)	1,8176 (1,4036)	1,1106 (1,3258)

3 Monaten Vorimmunisation zeigte das Isoimmundiagramm eine deutliche Tendenz zur Toleranz bei 10 µg, die auf einen sehr niedrigen Wert der Mischseren zurückzuführen war. Bei diesem niedrigen Titer der Mischseren darf erwartet werden, daß er dem geometrischen Mittel der Einzelseren sehr nahe kommt und entsprechend beurteilt werden kann.

d) Vergleich beider Insulinchargen nach der Testimmunisation

Die Ergebnisse nach der Immunisation mit den beiden Insulinchargen ließen sich miteinander vergleichen, da die geometrischen Mittelwerte der Einzelabnahmen bei beiden Chargen zu denselben Kontrollgruppen in Beziehung gesetzt worden waren.

Im Hochdosisbereich konnte nach 1 mal krist. Insulin bei der Dosis von 100 µg und 2 monatiger Immunisation eine Toleranz statistisch signifikant nachgewiesen werden. Nach Vorbehandlung mit MC-Insulin fehlte jedoch die Toleranz zum gleichen Zeitpunkt. Eine Tendenz zur Toleranz fand sich aber in den Mischseren nach dreimonatiger Immunisation mit MC-Insulin bei der Dosis von 10 µg. Daher trat die Hochdosistoleranz nach 1 mal krist. Insulin, welches noch höhermolekulare Unreinheiten enthielt, zeitlich eher auf als nach dem hochgereinigten, monomeren MC-Insulin.

Im Niedrigdosisbereich wurde sowohl für 1 mal krist. Insulin als auch für MC-Insulin eine Toleranz bei der Dosis 10 ng nach 2 monatiger Immunisation statistisch gesichert. Der zwischen beiden Bereichen liegende mittlere Dosisbereich um 1 µg deutete bei beiden Insulinchargen eine normale Reaktion an und trennte somit die Zone der Hochdosistoleranz von der Zone der Niedrigdosistoleranz.

e) Vergleich beider Insulinchargen während der Immunisationsperiode ohne Adjuvans

Die Entwicklung von Antikörpern nach Immunisation mit 1 mal krist. Insulin und MC-Insulin ohne Adjuvans, also während der

Immunisationsperiode und vor der Testimmunisation, wurde mit Mischseren verfolgt. Im Verlaufe der dreimonatigen Immunisation haben sowohl bei 1 mal krist. Insulin als auch bei MC-Insulin nur zwei Dosen Antikörper erzeugen können: die höchste Dosis von 100 µg nach kurzer Immunisation (Abb. 15, Gruppe A) und die Dosis von 1 µg nach längerer Immunisation (Abb. 15, Gruppen B - D).

Bei der höchsten Dosis trat ein nachweisbarer, aber sehr kleiner Antikörpertiter bei beiden Insulinchargen nach einer Immunisation von 2 Wochen auf, der nach längerer Immunisation wieder verschwand. Bei der Dosis von 1 µg dagegen fand sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Insulinchargen. Nach 1 mal krist. Insulin (Abb. 15 rechts) zeigte sich nach 1 Monat Immunisation ein geringer Antikörpertiter, der mit zunehmender Dauer der Immunisation (Gruppen C und D) stark anstieg. Nach Immunisation mit MC-Insulin wurde dagegen erst nach einer Immunisationsdauer von 3 Monaten ein sehr geringer Antikörpertiter festgestellt. Dieser geringe Titer von nur $10^{1,6232}$ pg/ml ABC 50 % ließ sich mit Dreifach-Bestimmungen deutlich nachweisen und durch nicht markiertes Insulin im Überschuß absorbieren. Er war daher kein Artefakt. Das unreinere nur krist. Insulin hat somit nach kürzerer Zeit aber mit den gleichen Dosen Insulinantikörper erzeugen können als das wesentlich reinere MC-Insulin.

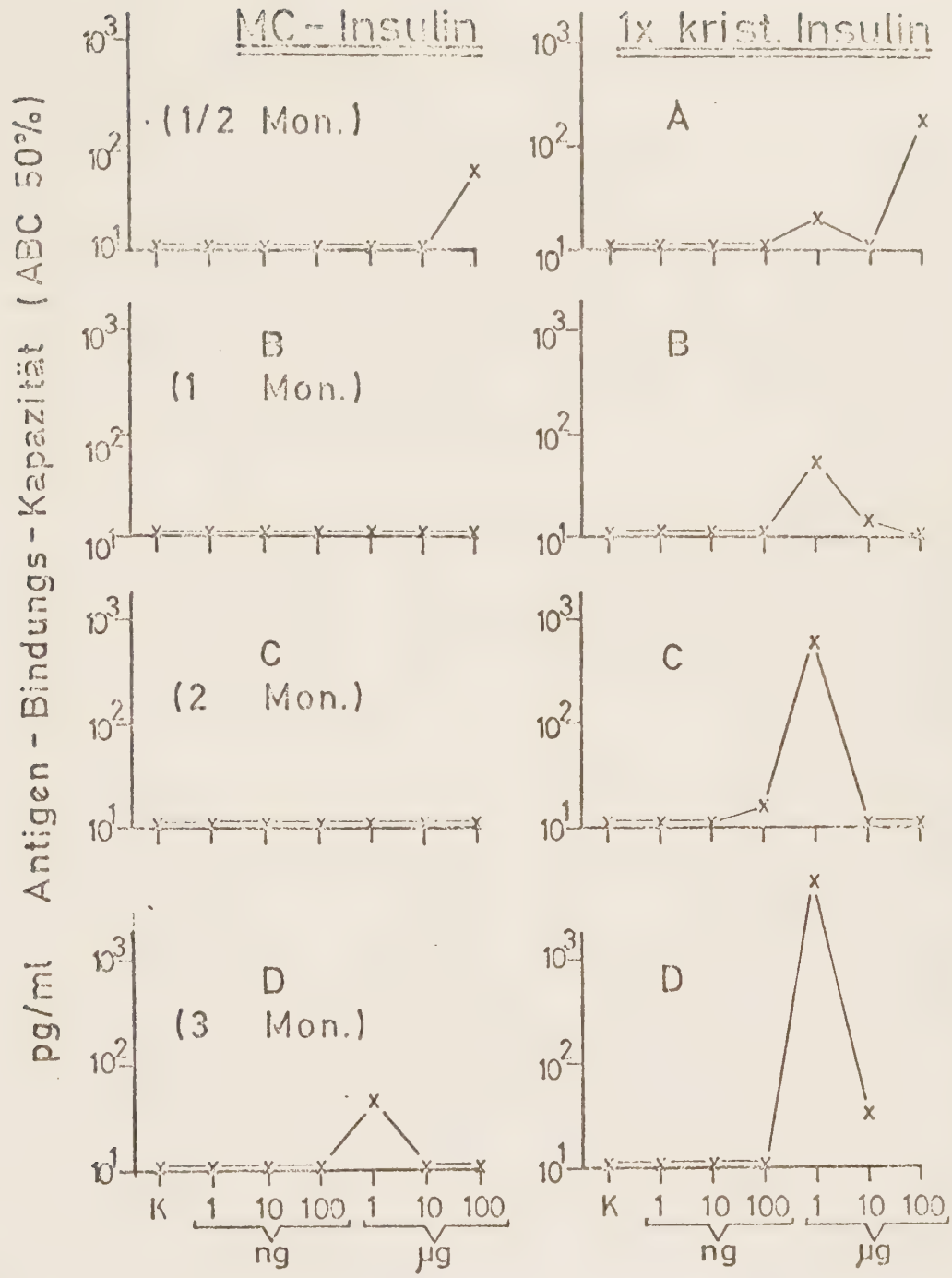


Abb.: 15

Immunogenität von 1 mal krist. Insulin und MC-Insulin. Die Antikörpertiter nach Immunisation mit MC-Insulin (linke Seite) und 1 mal krist. Insulin (rechte Seite) vor der Testimmunisation, d.h. ohne Adjuvans, werden als pg/ml ABC 50% angegeben. Die untereinander liegenden Diagramme entsprechen einer verschieden langen Immunisationsdauer von 1/2 Monat (Gruppe A), 1 Monat (Gruppe B), 2 Monaten (Gruppe C) und 3 Monaten (Gruppe D).

f) Insulitis

1. Histologie

Die histologische Untersuchung war nur an den Gruppen der dreimonatigen Immunisationsperiode mit 1 mal krist. oder MC-Insulin durchgeführt worden. Von den ursprünglich 120 Experimentaltierenhatten noch 79 überlebt. Als Kontrolle diente die zugehörige Gruppe mit 8 überlebenden Mäusen, welche 3 Monate lang Puffer und bei der Testimmunisation Insulin in komplettem Freundschen Adjuvans erhalten hatte.

Obwohl diese positive Kontrollgruppe eine Testimmunisation mit 1 mal krist. Insulin in komplettem Freundschen Adjuvans zur Toleranzprüfung erhalten hatte, zeigte keines der überlebenden 8 Kontrolltiere histopathologische Veränderungen im Sinne einer Insulitis. Wohl aber fand sich bei 14 von den 79 Experimentaltieren eine deutliche Insulitis, die erst ab 15 Infiltrationszellen in Serienschnitten als beginnende Insulitis angesehen wurde (Abb. 16). Ausgeprägte Insulitiden zeigten eine wesentlich stärkere Infiltration (Abb. 17). Im allgemeinen waren nur einzelne Inseln des Pankreas (etwa 10 %) durch entzündliche Veränderungen betroffen. Häufig war das Infiltrat zwischen den Inseln und dem Gefäßpol lokalisiert, in manchen Fällen schien es die Inseln zu komprimieren (Abb. 18). Die Bezeichnung Peri-Insulitis wäre daher exakter, der Einfachheit halber wird aber die Bezeichnung Insulitis beibehalten. Generell bestanden keine Zerstörungen der normalen Inselstruktur oder degenerative Veränderungen in den ß-Zellen. Zytologisch waren an der Insulitis hauptsächlich Lymphozyten und Monozyten beteiligt.

2. Verteilung auf Insulinchargen und -dosen

Die Insulitis wurde nach der 3 Monate langen Immunisierung mit 1 mal krist. Insulin nur in den Gruppen, welche die geringen Dosen von 1 ng und 10 ng erhalten hatten, gefunden (Abb. 20).

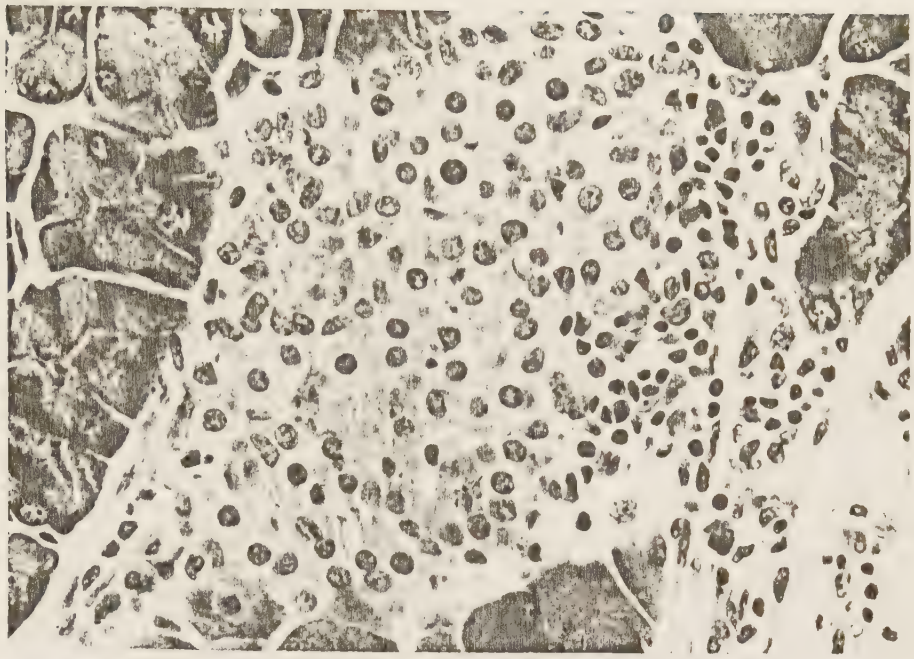


Abb.: 16

Beginnende, aber sichere Insulitis nach 3 Monaten Immunisation mit 1 mal kristallisiertem Insulin ohne Adjuvans und einer Testimmunisation in kompl. Freundschen Adjuvans (PAS,x 500).

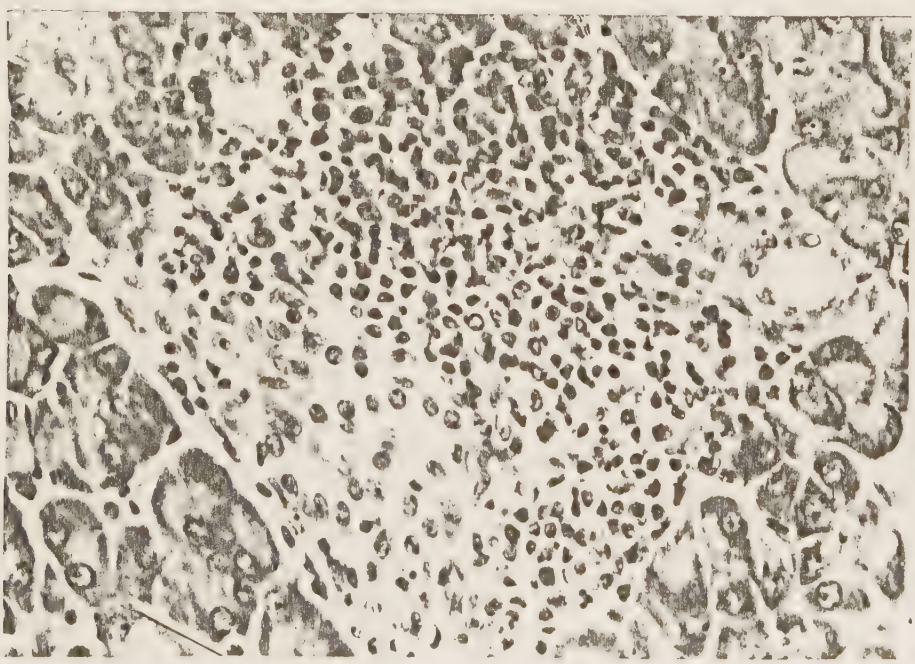


Abb.: 17

Ausgeprägte Insulitis mit starker Infiltration nach 3 Monaten Immunisation mit MC-Insulin ohne Adjuvans und einer Testimmunisation mit kompl. Freundschen Adjuvans (PAS,x 500).

Abb.: 18

Vom Gefäßpol ausgehende Infiltration der Inseln nach Immunisation mit 1 mal kristallisiertem Insulin ohne Adjuvans und einer Testimmunisation mit kompl. Freundschen Adjuvans (PAS,x 300).

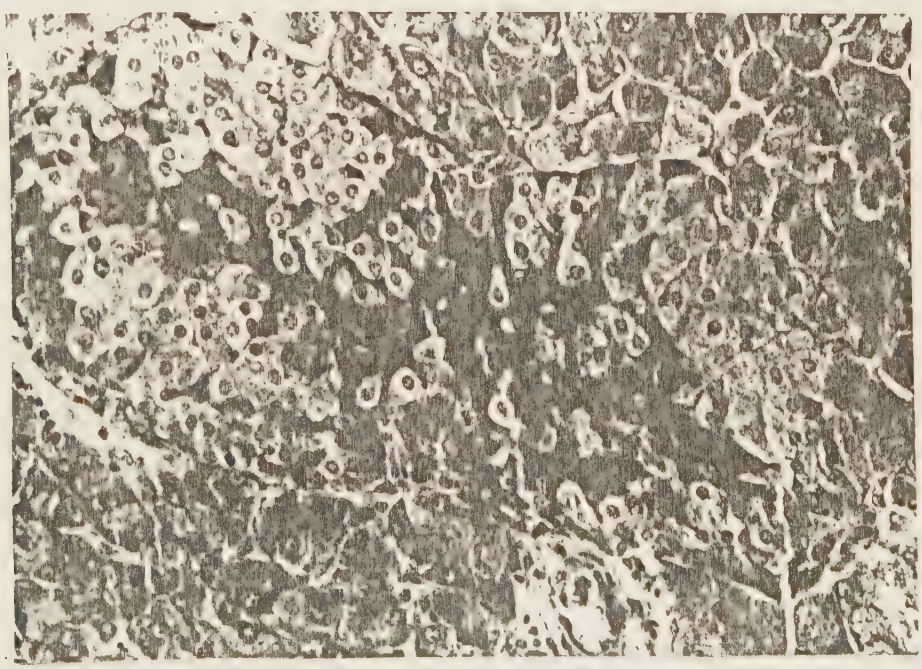


Abb.: 19

Degranulierung einer Insel des Pankreas nach 3 Monaten Immunisation mit 1 mal kristallisiertem Insulin ohne Adjuvans und einer Testimmunisation mit kompl. Freundschen Adjuvans (Aldehyd-Fuchsin nach GÖMÖRI,x 500).

In diesen beiden Gruppen fand sich bei 7 Tieren, d.h. 54 %, eine Insulitis, in den Gruppen mit höherer Dosierung dagegen bei keinem von 24 Tieren. Da es sich bei diesem Versuch um eine erste Untersuchung handelte, konnten vor dem Versuch keine statistischen Hypothesen aufgestellt werden. Statistische Methoden können daher nicht ohne Einschränkung angewandt werden. Sie würden aber den beschriebenen Unterschied zwischen den beiden erst nachträglich zusammengefaßten Gruppen als signifikant auf dem Niveau von p 0,02 herausgestellt haben. Es wurde kein wesentlicher Unterschied zwischen Tieren festgestellt, die eine oder zwei Testimmunisationen erhalten hatten (siehe D II f Histologische Untersuchung).

Nach der Immunisation mit MC-Insulin fand sich die Insulitis im Gegensatz zu den vorherigen Befunden nur bei hohen Insulindosen, nämlich 1 µg, 10 µg und 100 µg, in diesen drei Gruppen hatten 7 Tiere von 20, d.h. 35 %, eine Insulitis im Vergleich zu keinem von 22 Tieren bei der niedrigen Dosierung. Auch dieser Unterschied wäre unter der oben genannten Einschränkung mit statistischen Methoden auf dem Niveau von p 0,01 signifikant gewesen.

Die Feststellung, daß nur 1 x krist. Insulin mit den kleinen Dosen von 1 ng, 10 ng und 100 ng eine Insulitis erzeugte, MC-Insulin aber nicht, ließ sich statistisch auf dem Niveau von p 0,01 sichern und die zweite Feststellung, daß nur MC-Insulin mit den hohen Dosen von 1 µg, 10 µg und 100 µg eine Insulitis erzeugte nicht aber 1 x krist. Insulin ,war mit p $<$ 0,02 statistisch signifikant.

3. Beziehung zu Insulinantikörpern

Die Gruppe von Tieren, die bei einer Dosis von 1 µg 1 mal krist. Insulin in Mischseren einen hohen Antikörpertiter von etwa 50 ng/ml ABC 50 % mehr als 5 Monate lang unterhalten hatte, zeigte trotzdem bei keinem der 7 Tieren eine Insulitis (Abb. 20). Tiergruppen in den niedrigen Dosisbereichen von 1 ng und 10 ng

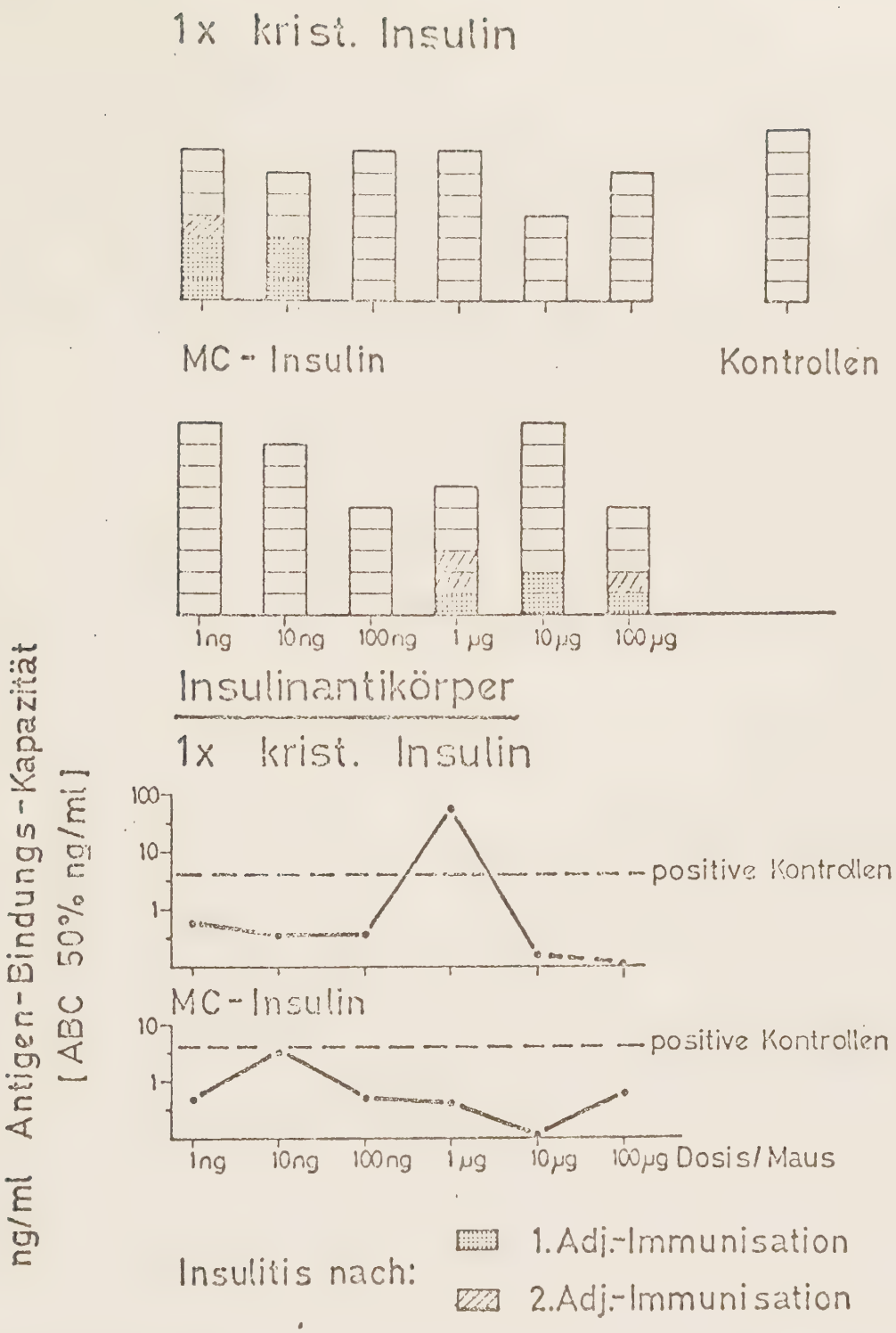


Abb.: 20

Vergleich des Auftretens von lymphozytärer Insulitis (beide oberen Abb.) nach 1 mal krist. Insulin und nach MC-Insulin in Abhängigkeit von der Dosis der Immunisation (Abszisse). Jedes Rechteck repräsentiert ein Tier. Die unteren beiden Diagramme geben den jeder Dosisgruppe zugehörigen Insulinantikörpertiter für die beiden Insulinchargen wieder.

hatten zu 54 % eine Insulitis, obwohl ihre Mischseren nur etwa 1 % der Antikörper der Dosis 1 ug, nämlich 0,6 bzw. 0,3 ng/ml ABC 50 % aufwiesen. Tiergruppen in der Hochdosistoleranzzone mit 1 mal krist. Insulin wiesen keine Insulitis auf. Bei MC-Insulin dagegen fanden wir in der toleranten Gruppe mit der Dosis von 10 ug, welche praktisch kaum Insulinantikörper erzeugt hatte (0,021 ng/ml ABC 50 %), 2 Insulitiden bei 9 Tieren. Daher war keine Beziehung zu Insulinantikörpern feststellbar. Auch bei individuell untersuchten Tieren ließ sie sich nicht nachweisen. In einer Vierfelderkorrelation zeigte sich bei 37 Tieren ein Koeffizient V = 0,001. Von 4 Tieren, welche eine Insulitis aufwiesen, hatten zwei gute Antikörpertiter, zwei andere aber keine (Tabelle 7).

g) Periduktulitis

1. Histologie

Bei 28 der 79 Experimentaltiere und 8 Kontrollen, welche die Immunisationsperiode und die 5 Monate lange Testperiode noch überlebt hatten, wurde eine periduktuläre Infiltration des Pankreas beobachtet, die manchmal von einer interstitiellen Pankreatitis begleitet war (Abb. 21). Eine Periduktulitis wurde dann als sicher angenommen, wenn mehr als 15 Infiltratzellen in Serienschnitten gefunden wurden. Im allgemeinen erfaßte die Periduktulitis nicht alle Pankreasgänge. Bei einer Infiltration erschien der Pankreasgang dilatiert aber noch intakt. Die Infiltrate bestanden aus mononukleären Zellen, die als Lymphozyten oder Monozyten klassiert werden können.

2. Verteilung auf Insulinchargen und -dosen

Bei den vier Tieren der Kontrollgruppe, die nur eine Testimmunisation von 1 mal krist. Insulin erhalten hatten, wurde keine Periduktulitis beobachtet, wohl aber bei den anderen vier Kontrolltieren mit zwei Testimmunisationen (siehe D II f).

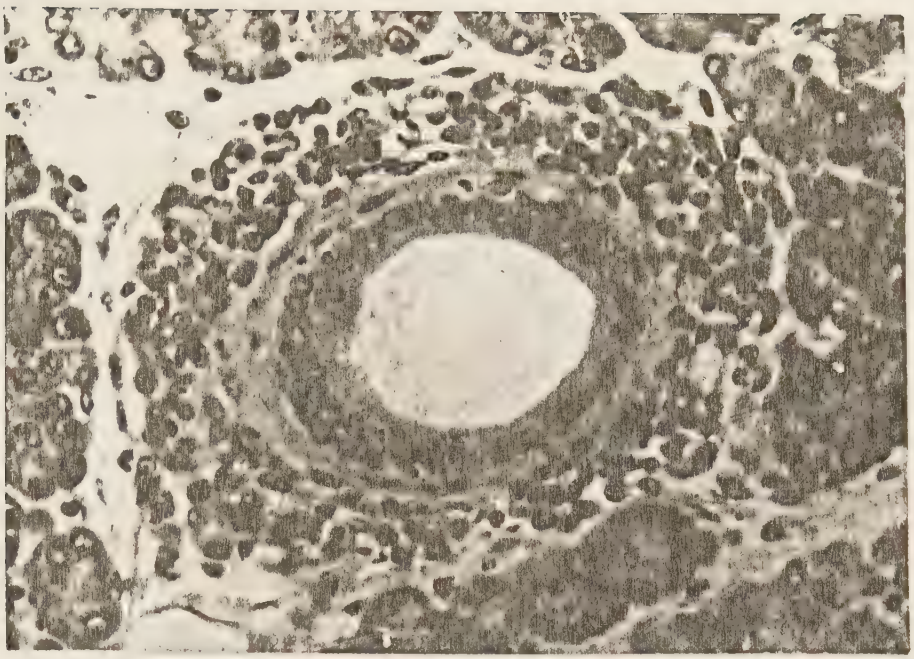


Abb.: 21

Ausgeprägte Periduktulitis ohne Veränderungen der Duktusepithelien nach 3 Monaten Immunisation mit 1 x krist. Insulin ohne Adjuvans und einer Testimmunisation mit kompl. Freundschen Adjuvans (PAS,x 500).

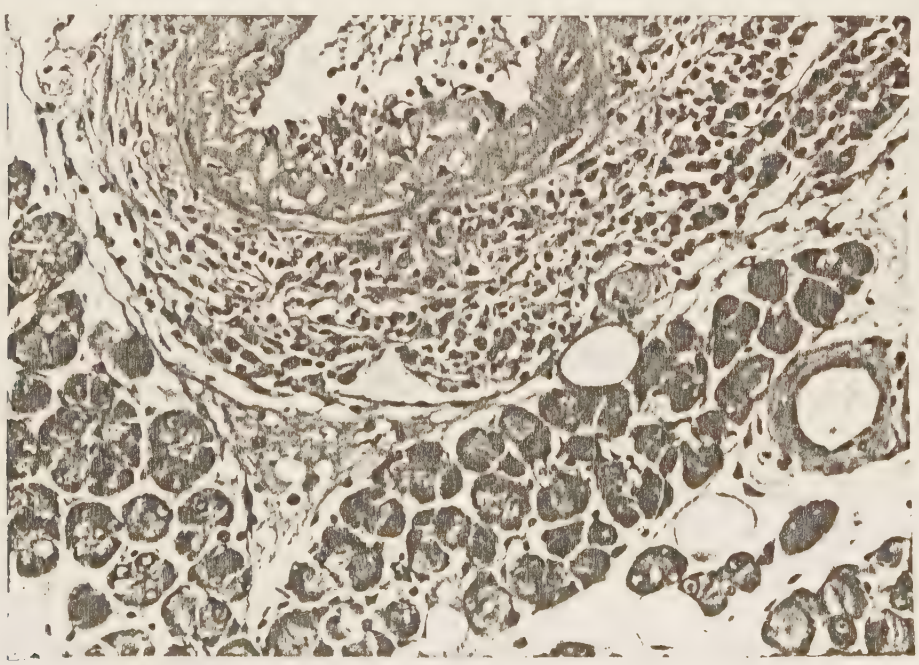


Abb.: 22

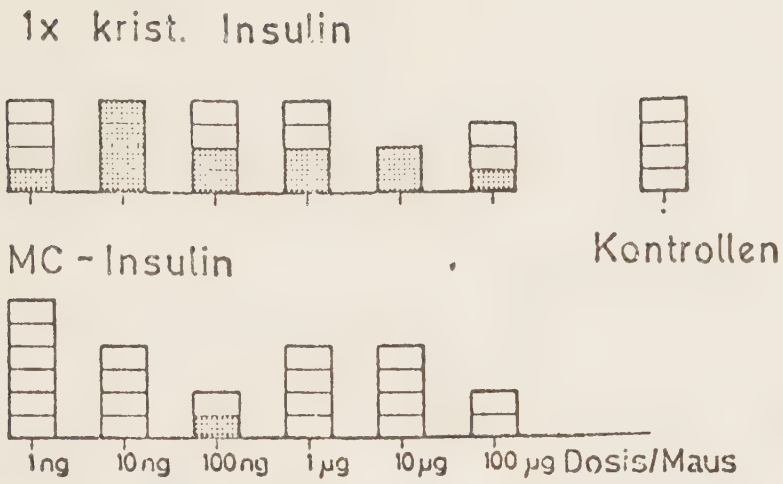
Arteriitis nach 3 Monaten Immunisation mit 1 x krist. Insulin ohne Adjuvans und einer Testimmunisation mit kompl.Freundschen Adjuvans (PAS,x 300).

Da die Kontrolltiere daher in der Lage waren, nach 2 Testimmunisationen eine Periduktulitis zu erzeugen, konnte auch bei jedem beliebigen Experimentaltier nach 2 Testimmunisationen mit einer Periduktulitis gerechnet werden. Entsprechend fanden sich bei den 36 Versuchstieren nach zwei Testimmunisationen keine signifikanten Unterschiede zwischen 1 mal krist. Insulin und MC-Insulin. So ließ sich bei 7 von 16 Tieren nach 1 mal krist. Insulin und 7 von 20 Tieren nach MC-Insulin eine Periduktulitis ohne deutliche Abhängigkeit von der Immunisationsdosis nachweisen.

Betrachtet man dagegen die 43 Tiere mit nur einer Testimmunisation (Abb. 23) so finden sich die Periduktulitiden fast nur in der Gruppe mit 1 mal krist. Insulin, und zwar bei 12 von 21 Tieren, während die mit MC-Insulin behandelten Tiere nur einen Fall bei 22 Tieren zeigten. Mit den vorher bei der Insulitis besprochenen Einschränkungen wäre der Unterschied zwischen allen mit 1 mal krist. Insulin und allen mit MC-Insulin behandelten Tieren auf dem Niveau von $p < 0{,}002$ signifikant gewesen.

3. Beziehung zu Insulinantikörpern

Der Vergleich der Antikörpertiter einzelner Dosisgruppen nach 1 mal krist. Insulin mit dem Auftreten der Periduktulitis läßt keine innere Beziehung erkennen. Die Dosisgruppe mit dem höchsten Antikörpertiter (1 ug) wies ebenso eine Periduktulitis auf wie Gruppen mit wenig Antikörpern bei den Dosen 1 ng, 10 ng, und 100 ng (partiell tolerante Gruppen) oder den toleranten Gruppen bei den Dosen 10 ug und 100 ug. In gleicher Weise blieb das Auftreten der Periduktulitis ohne Beziehung zu Insulinantikörpern nach der Immunisation mit MC-Insulin. Unabhängig davon, ob hohe, niedrige oder keine Insulinantikörper vorhanden waren, fand sich nur eine einzige Periduktulitis bei 22 Tieren. Entsprechend diesem Befund wurde auch bei 37 individuell untersuchten Tieren (das sind jene, welche eine zweite Testimmunisation erhalten hatten) in einer Vierfelderkorrelation für Insulinantikörper und Periduktulitis nur



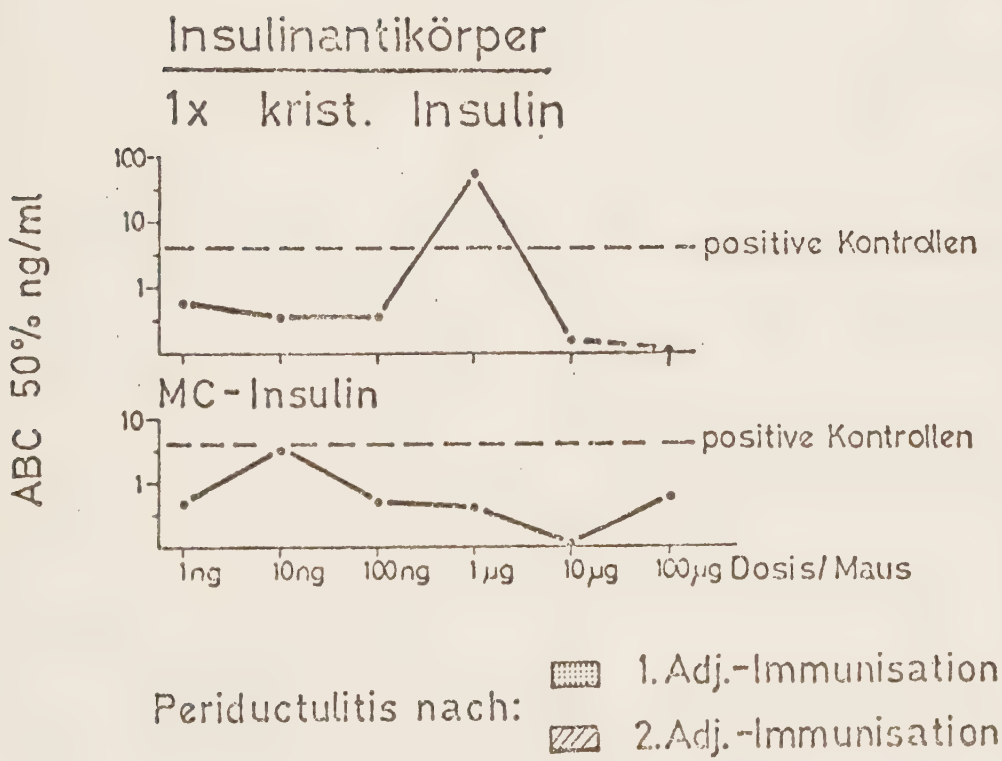


Abb.: 23

Vergleich des Auftretens von lymphozytärer Periduktulitis (beide oberen Abb.) nach 1 mal krist. Insulin und nach MC-Insulin in Abhängigkeit von der Dosis(Abszisse)(Tiere nach 1 Testimmun.)Jedes Rechteck repräsentiert ein Tier. Die beiden unteren Diagramme geben den jeder Dosisgruppe zugehörigen Insulinantikörpertiter für beide Insulinchargen wieder.

Tabelle 7

Vierfelderkorrelation für das Auftreten von Insulitis und Antikörpern

Insulitis:

Antikörperkonz.: + ≥ 0,05 ng/ml - < 0,05 ng/ml ABC 50 %		+	-	gesamt
	+	2	13	15
	-	2	20	22
	gesamt	4	33	37

V = 0,001

Tabelle 8

Vierfelderkorrelation für das Auftreten von Periduktulitis und Antikörpern

Periduktulitis:

Antikörperkonz.: + ≥ 0,05 ng/ml - < 0,05 ng/ml ABC 50 %		+	-	gesamt
	+	7	8	15
	-	8	14	22
	gesamt	15	22	37

V = 0,10

ein Koeffizient von V = 0,10 errechnet.(Tabelle 8) 7 Tiere mit Periduktulitis hatten gleichzeitig Insulinantikörper, aber auch 8 Tiere ohne Periduktulitis zeigten Insulinantikörper, während weitere 8 Tiere mit Periduktulitis keine Antikörper aufwiesen.

Als auffälliger Befund war zu werten, daß 3 von 5 Tieren aus den toleranten Gruppen nach 1 mal krist. Insulin eine Periduktulitis aufwiesen.

Ein Vergleich des Auftretens der Periduktulitis mit der Insulitis ergab, daß die Insulitis bei beiden Insulinchargen vorkam, die Periduktulitis dagegen praktisch nur nach 1 mal krist. Insulin (Abb. 24). Außerdem war die Insulitis nach 1 mal krist. Insulin streng an eine geringe Dosierung gebunden, während die Periduktulitis bei allen Dosen vorkam.

h) Glucosetoleranz

1. Normalwerte

Die Normalwerte der Blutglucose nach einer Glucosebelastung wurden bei 20 nicht immunisierten NMRI-Mäusen bestimmt und mit den nur mit Puffer immunisierten Kontrollen verglichen. Sie wurden als Δ E, d.h. Glucosewert 2 Stunden nach Belastung minus Glucosewert vor Belastung, ausgedrückt. Der Δ E-Mittelwert betrug 26 mg % mit einer Standardabweichung von 7 mg %. Die obere 3 Sigmagrenze lag bei 47 mg % und wurde als obere Grenze des Normbereichs angesehen. Alle Werte der 20 nicht immunisierten Tiere blieben unterhalb der 2 Sigma-Grenze, die der 3 Monate mit Puffer immunisierten Kontrolltiere vor der Testimmunisation ebenfalls.

2. Verteilung auf Insulinchargen und -dosen

Die Glucosetoleranz wurde dreimal bestimmt, zweimal nach der Immunisationsperiode ohne Adjuvans und später nach der Testimmunisation mit Adjuvans. Um herauszufinden, ob nach einer Immunisationszeit von nur 2 Monaten bereits pathologische Veränderungen zu finden waren, wurde die G.T. in einem Vorversuch

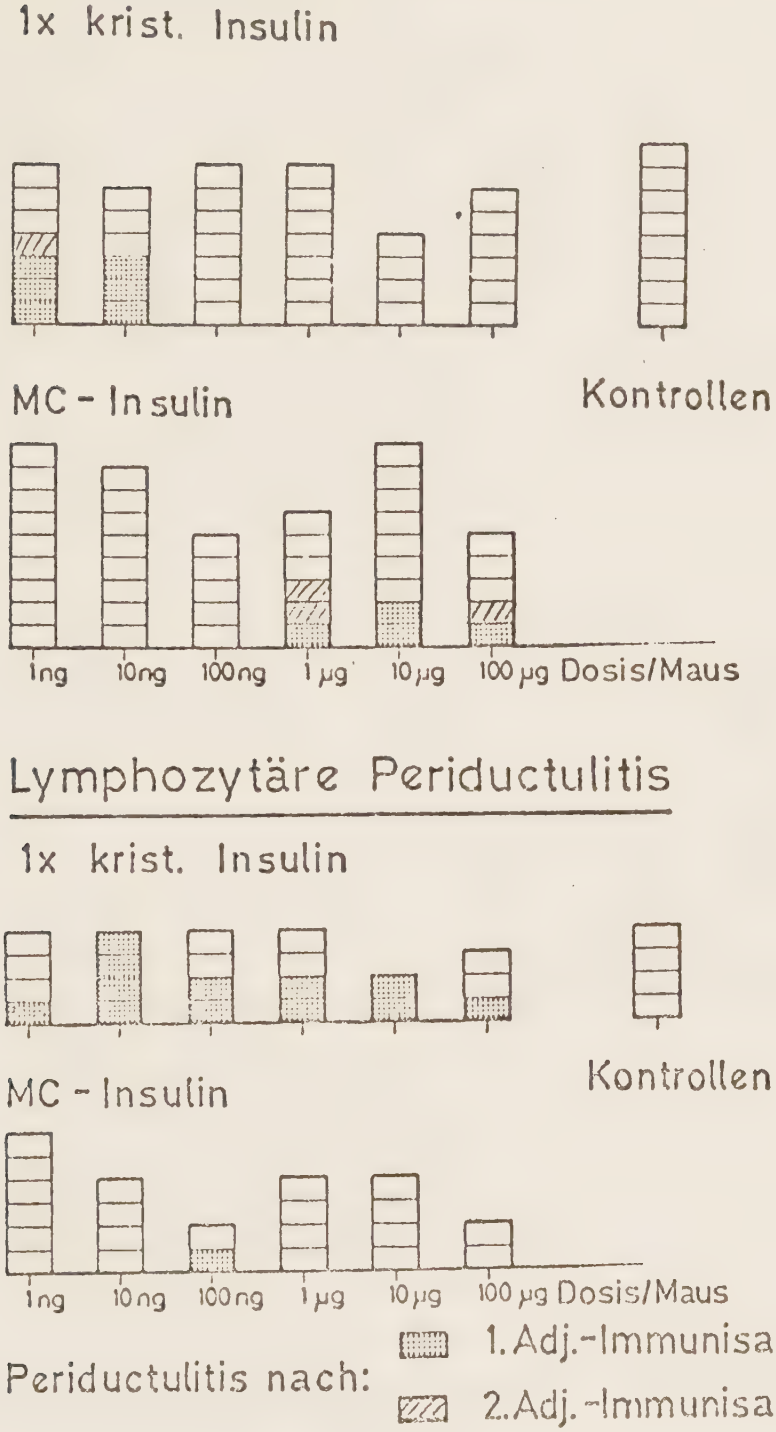


Abb.: 24

Vergleich des Auftretens von Insulitis (beide oberen Abb.) mit dem Auftreten von Periduktulitis (beide unteren Abb.). Jedes von beiden ist sowohl nach Immunisation mit 1 mal krist. Insulin als auch nach MC-Insulin dargestellt. Ein Rechteck repräsentiert ein Tier (Ordinate), schraffierte Rechtecke bedeuten pathologische Befunde, weiße Rechtecke keine Befunde. Auf der Abszisse sind die Dosisgruppen der Immunisation wiedergegeben.

zunächst nur an 14 Mäusen vor der Testimmunisation untersucht. 3 Mäuse aus der Gruppe mit 10 ug und 2 Mäuse aus jener mit 100 ug 1 mal krist. Insulin sowie je 3 Mäuse aus den Gruppen mit 10 ug und mit 100 ug MC-Insulin wurden mit einer Kontrollgruppe von 3 Tieren verglichen (Abb. 25 oben). Während die Kontrollen normale Werte aufwiesen, fanden sich bei beiden Insulinchargen pathologische Werte: in der Gruppe mit 1 mal krist. Insulin bei 2 von 5 Tieren und in der Gruppe mit MC-Insulin bei 3 von 6 Tieren. Die 3 Sigmagrenze von 47 mg % wurde bis zu Werten von 200 mg % überschritten. Dies scheint anzudeuten, daß beide Insulinchargen ähnliche Veränderungen der G.T. bewirken können. In diesem Vorversuch waren jedoch nur die beiden höchsten Dosisgruppen untersucht worden.

Eine vollständigere Untersuchung aller Dosisgruppen wurde an 60 anderen Tieren nach dreimonatiger Immunisation mit 1 mal krist. Insulin oder MC-Insulin vor der Testimmunisation durchgeführt. Aus jeder Gruppe wurden diesmal 5 beliebige Tiere untersucht. Die Kontrolltiere zeigten wie vorher normale Werte. Bei den 30 Tieren nach Immunisation mit MC-Insulin lagen am 11. Tag nach der letzten Immunisation jetzt die Blutglucosewerte ebenfalls innerhalb des Normbereiches sogar innerhalb des 2 Sigmabereiches. Dagegen zeigten 6 von 25 der mit 1 mal krist. Insulin behandelten Tiere schwache, aber deutlich pathologische Werte, welche die 3 Sigmagrenze von 47 mg % überschritten (Tabelle 9). Bei der statistischen Berechnung muß wie vorher der Einwand erhoben werden, daß die statistischen Hypothesen nicht vor Versuchsbeginn formuliert werden konnten, da es sich um ein erstes Experiment handelte. Die Unterschiede hätten sich aber signifikant auf dem Niveau von p = 0,02 sichern lassen.

Als die gleichen Tiere eine Woche vorher, d.h. am 4. Tage nach der letzten Immunisation untersucht worden waren, hatten drei weitere Tiere eine pathologische G.T., die aber am 11. Tag nicht mehr nachweisbar war. Davon waren 1 Tier mit 1 mal krist. Insulin und 2 Tiere mit MC-Insulin in hohen Dosen behandelt worden. Daher kann MC-Insulin in hohen Dosen ebenfalls eine pathologische G.T. bewirken.

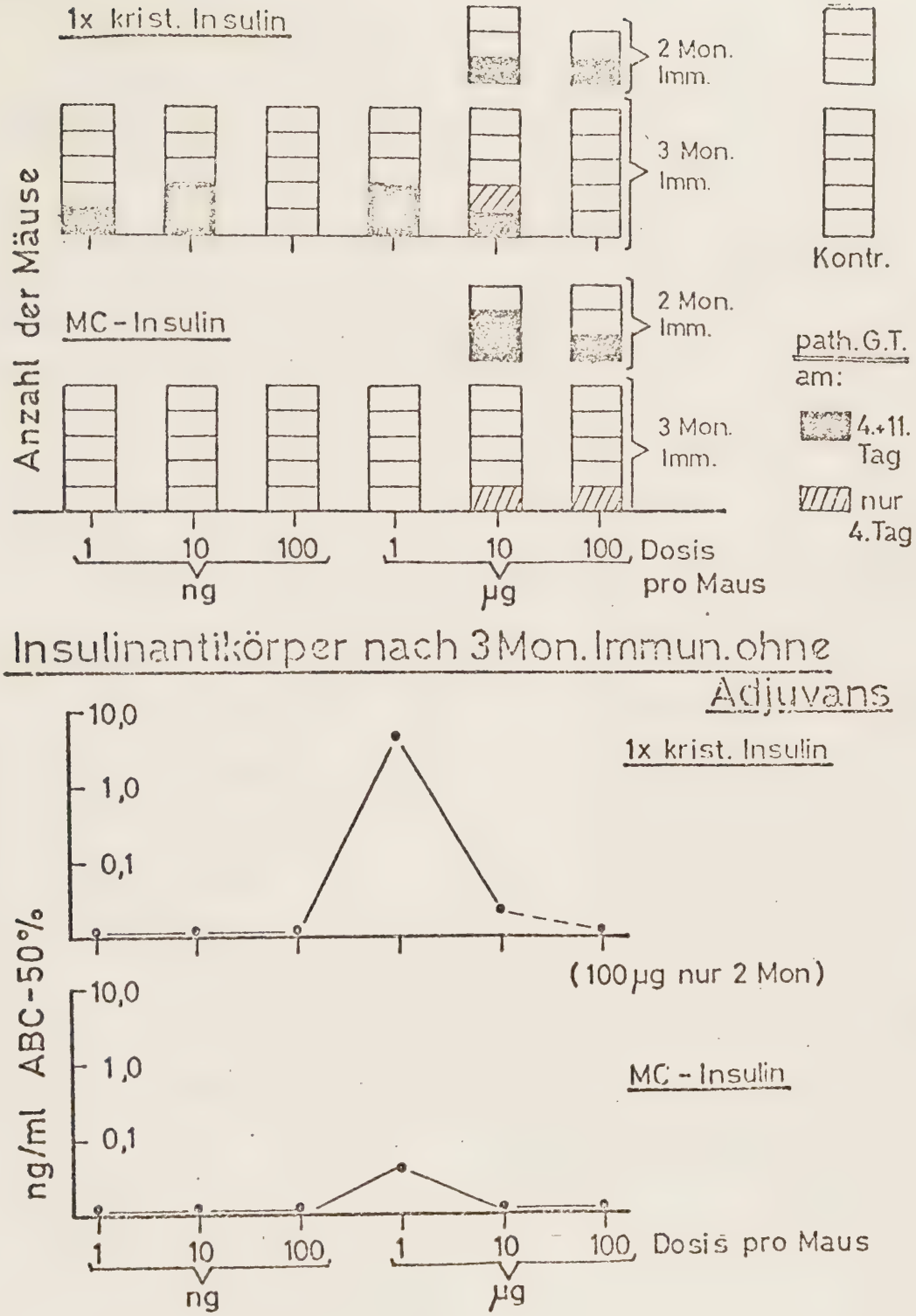


Abb.: 25

Vergleich des Auftretens pathologischer Glucosetoleranzwerte (beide oberen Abb.) nach 1 mal krist. Insulin und nach MC-Insulin in Abhängigkeit von der Dosis der Immunisation (Abszisse). Jedes Rechteck repräsentiert ein Tier. Die beiden unteren Diagramme geben den jeder Dosisgruppe zugehörigen Insulinantikörpertiter der beiden Insulinchargen wieder.

Tabelle 9

Werte des Glucosetoleranztests der Mäuse, welche die obere 3 Sigmagrenze normaler Werte überschritten. Diese Mäuse waren 3 Monate lang mit 1 mal krist. Insulin ohne Adjuvans immunisiert worden.

Immunisationsdosis	GTT (2 Std. nach Belastung)
1. 1 ng	E 68 mg %
2. 10 ng	E 68 mg %
3. 10 ng	E 58 mg %
4. 1 ug	E 50 mg %
5. 1 ug	E 58 mg %
6. 10 ug	E 52 mg %

20 Kontrolltiere — Mittelwert E = 26

Standardabweichung 7 mg %

Erst 5 Monate nach der Testimmunisation, bei der alle Tiere einschließlich der Kontrollen mit 1 mal krist. Insulin in komplettem Freundschen Adjuvans immunisiert worden waren, wurden weitere G.T. Untersuchungen durchgeführt. Die positiven Kontrollen wiesen jetzt eine pathologische G.T. mit hohen Werten weit über der 3 Sigmagrenze auf. Bei vier Mäusen waren folgende Werte aufgetreten: 1 E 48 mg %, 122 mg %, 136 mg % und 204 mg %. Der Versuch konnte daher nach der Testimmunisation nicht weiter ausgewertet werden und zeigte, wie zu erwarten, eine irreguläre Verteilung pathologischer Werte unabhängig von der Insulincharge oder Insulindosis.

3. Beziehung zu Insulinantikörpern

Nach der Immunisationsperiode und vor der Testimmunisation ließ sich in der Verteilung der Mäuse mit pathologischer G.T. keinerlei Beziehung zu der Immunisationsdosis oder dem Insulinantikörpertiter feststellen. Die Dosisgruppe mit 1 ug 1 mal krist. Insulin und einem hohen Antikörpertiter von etwa 5 ng/ml ABC 50 % zeigte nur zwei pathologische G.T.-Werte. Bei allen anderen höheren und niedrigeren Dosen wurden aber ebenfalls pathologische Werte gefunden, obwohl keine Antikörper vorhanden waren. Sogar die geringsten Dosen von 1 ng und 10 ng erzeugten pathologische Werte der G.T. allerdings nur mit einmal kristallisiertem Insulin.

Der Einfluß der Höhe der Antikörpertiter auf die Schwere der pathologischen Glucosetoleranz wurde bei den Mäusen, welche eine 3 Monate lange Immunisationsperiode und zwei Testimmunisationen erhalten hatten, geprüft und graphisch dargestellt (Abb. 26).

Nur 3 Tiere hatten gleichzeitig pathologische G.T.-Werte und Insulinantikörper, bei 6 anderen Tieren mit Antikörpern fehlten pathologische Werte und bei weiteren 6 Mäusen mit pathologischer G.T. fehlten wiederum Insulinantikörper. Die Werte nach einer

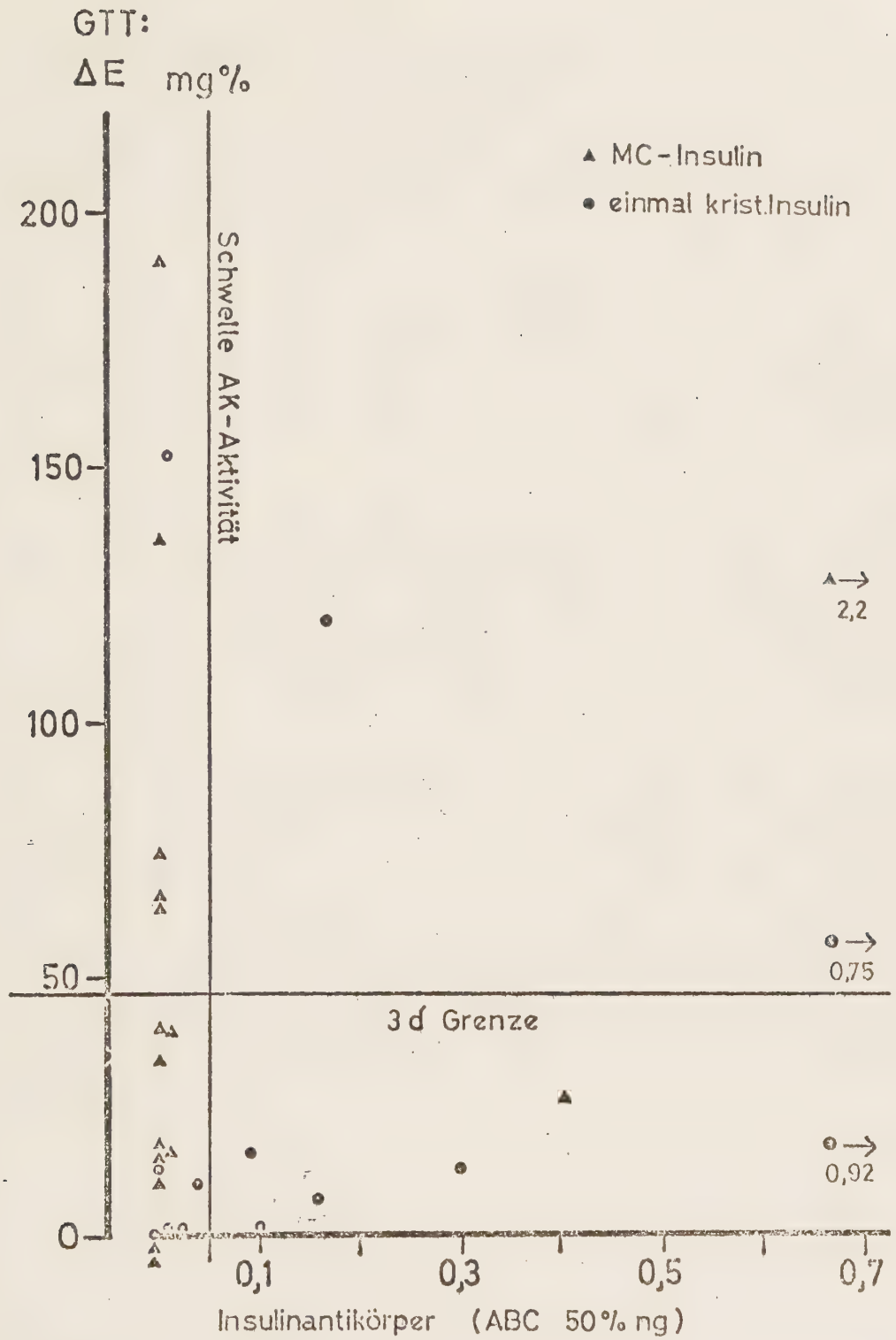


Abb.: 26

Korrelation zwischen den Werten der Glucosetoleranz - GTT- (Ordinate) und den Insulinantikörpertitern (Abszisse). Dreiecke repräsentieren die mit MC-Insulin vorbehandelten Tiere, Punkte jene nach 1 mal krist. Insulin. Die obere 3 Sigma-Grenze für normale GTT-Werte und die Nachweisschwelle für Antikörper wurden parallel zu der Abszisse bzw. Ordinate eingezeichnet, um pathologische von normalen Werten zu unterscheiden.

Vorbehandlung mit MC-Insulin lagen größtenteils auf der Ordinate, d.h. eine pathologische G.T. trat auf, ohne daß gleichzeitig Insulinantikörper vorlagen. Daher ließ sich keine Korrelation zwischen Insulinantikörpertitern und der Schwere der pathologischen Glucosetoleranz feststellen.

Die Vierfelderkorrelationen zwischen G.T. und Insulitis sowie zwischen G.T. und Periduktulitis ließen ebenfalls keine Korrelationen erkennen, da beide Berechnungen nur einen Koeffizienten von V = 0,03 ergaben (Tabellen 10 und 11).

Neben den beschriebenen histologischen Veränderungen des Pankreas wurden auch Degranulationen der Inseln beobachtet (Abb. 19). Es fanden sich jedoch keine Zuordnungen zur Insulincharge oder Insulindosis, so daß eine weitere Auswertung nicht erfolgen konnte.

Bei den histologisch untersuchten Mäusen fand sich nur 1 mal eine gesicherte Arteriitis nach Immunisation mit 10ng 1 mal krist. Insulin (Abb. 22). Eine angedeutete Arteriitis wurde bei einem positiven Kontrolltier gefunden, welches eine Testimmunisation mit Insulin in Adjuvans erhalten hatte. Daher kann das Entstehen der beiden Arteriitiden auf die Testimmunisation mit komplettem Freundschen Adjuvans zurückzuführen sein.

Tabelle 10

Vierfelderkorrelation für das Auftreten von Insulitis und path. G.T.

Insulitis: \ path. G.T.:	+	-	gesamt
+	3	6	9
-	21	34	55
gesamt	24	40	64

V = - 0,04

Tabelle 11

Vierfelderkorrelation für das Auftreten von Periduktulitis und path. G.T.

Periduktulitis: \ path. G.T.:	+	-	gesamt
+	8	15	23
-	15	25	40
gesamt	23	40	63

V = - 0,03

IV. DISKUSSION

a) 1 mal krist. Insulin

In 1 mal krist. Insulin sind noch etwa 20 % andere Proteine enthalten, die zwar größtenteils mit dem "wahren" Sangerschen Insulin verwandt sind, aber im Molekulargewicht oder der Aminosäurenzusammensetzung stark verschieden sein können. Diese Insulincharge kann daher nicht als einheitliches Antigen mit einem einheitlichen Molekulargewicht betrachtet werden. Bei allen Immunreaktionen muß daher die Frage gestellt werden, ob und in welchem Maße die anderen Proteine daran beteiligt sind.

1. Immunogenität

Die Immunisation mit löslichem Insulin 3 mal pro Woche kommt der Immunisation eines Diabetikers während der Insulinbehandlung nahe, wenn sie auch nicht wie bei diesem täglich erfolgt. Dafür kann aber am Experimentaltier der Einfluß einer großen Variabilität der Insulindosen geprüft werden.

Insulinantikörper entstanden bereits nach einer Immunisation von 1/2 Monat mit Insulin ohne Adjuvans und zwar mit der höchsten Insulindosis von 100 µg. Nach längerer Immunisation verschwand dieser Antikörpertiter wieder vollständig. Da die gleiche Dosis nach längerer Immunisation, wie durch die Testimmunisation erwiesen, zu einer Toleranz führte, handelte es sich wahrscheinlich um eine vorübergehende Antikörperbildung wie sie vor dem Eintreten einer Hochdosistoleranz von MITCHISON 1968 für Albumin und von MATANGKASOMBUT und SEASTONE 1968, MEDLIN et al. 1969 für Polysaccharide beschrieben worden war.

Bei der mittleren Dosis von 1 µg Insulin fand sich nach 1 Monat Immunisation ohne Adjuvans ein deutlicher Insulinantikörpertiter, der mit der Dauer der Immunisation bis zu 3 Monaten auf das 100-fache anstieg. Die Dosis von 1 µg, umgerechnet in Dosis/kg Körpergewicht, entspricht beim Menschen ungefähr 25 IE/Tag.

Therapeutische Dosen von Insulin liegen zwischen 25 - 80 IE und bewirken bei vielen Diabetikern Insulinantikörper (BERSON et al. 1956 a, b). Da bei der Maus 10-fach höhere oder niedrigere Dosen bereits zu einer Toleranz führten, würde man annehmen, daß dies auch beim Menschen möglich sein könnte. Daher muß es als unglücklicher Zufall angesehen werden, daß therapeutische Dosen gerade in dem Bereich liegen, welcher beim Menschen Insulinantikörper erzeugt. Die für die Entstehung der Toleranz notwendigen 10 fach höheren oder niedrigeren Dosen (250 IE bzw. 25 IE) sind mit der Insulintherapie des Diabetikers nicht zu vereinbaren.

2. Tolerogenität

Eine zwei Monate dauernde Immunisation mit Insulin ohne Adjuvans erzeugte in Abhängigkeit von der Dosis zwei Toleranzzonen, eine im Hochdosisbereich und eine andere im Niedrigdosisbereich mit einer zwischen beiden liegenden Zone einer Normalreaktion mit Tendenz zur Stimulation. Die Individualabnahmen zeigten eine Heterogenität der Immunantwort der Mäuse des NMRI-Stammes. Die geometrischen Mittel waren zwar für die toleranten Gruppen (10 ng , 10 ug, 100 ug) signifikant von den Kontrolltieren unterschieden aber die zu große Streuung verhinderte, daß der Unterschied zwischen der möglicherweise stimulierten Gruppe (100 ng) und den Kontrollen signifikant wurde. Es gab jedoch Einzeltiere, welche die Kontrollen um mehr als 4 000 % übertrafen. Die Ergebnisse nach zweimonatiger Immunisation mit Insulin ähneln jenen nach zweiwöchiger Immunisation mit Flagellin, einem Bakterienprotein aus Salmonella adelaide (SHELLAM und NOSSAL 1968, Abb. 27). Die Dosen und Zeiten der Immunreaktionen nach diesen beiden Antigenen waren jedoch sehr verschieden. Mit Insulin waren für die Toleranz und die Normalreaktion wesentlich höhere Dosen erforderlich. Die Hochdosistoleranz wurde mit mindestens 10 ug Insulin erzeugt, benötigte aber mit Flagellin nur 500-fach niedrigere Dosen. Bei der Niedrigdosistoleranz waren die Dosisunterschiede noch größer. Die unterschiedliche Dauer für Toleranz und Antikörperstimulation war ebenfalls

2 Toleranzzonen mit:

1x krist. Insulin
(bei erwachs. NMRJ-Mäusen)

Flagellin: SHELLAM,NOSSAL
(bei neugeb. Wistarratten) 1968,

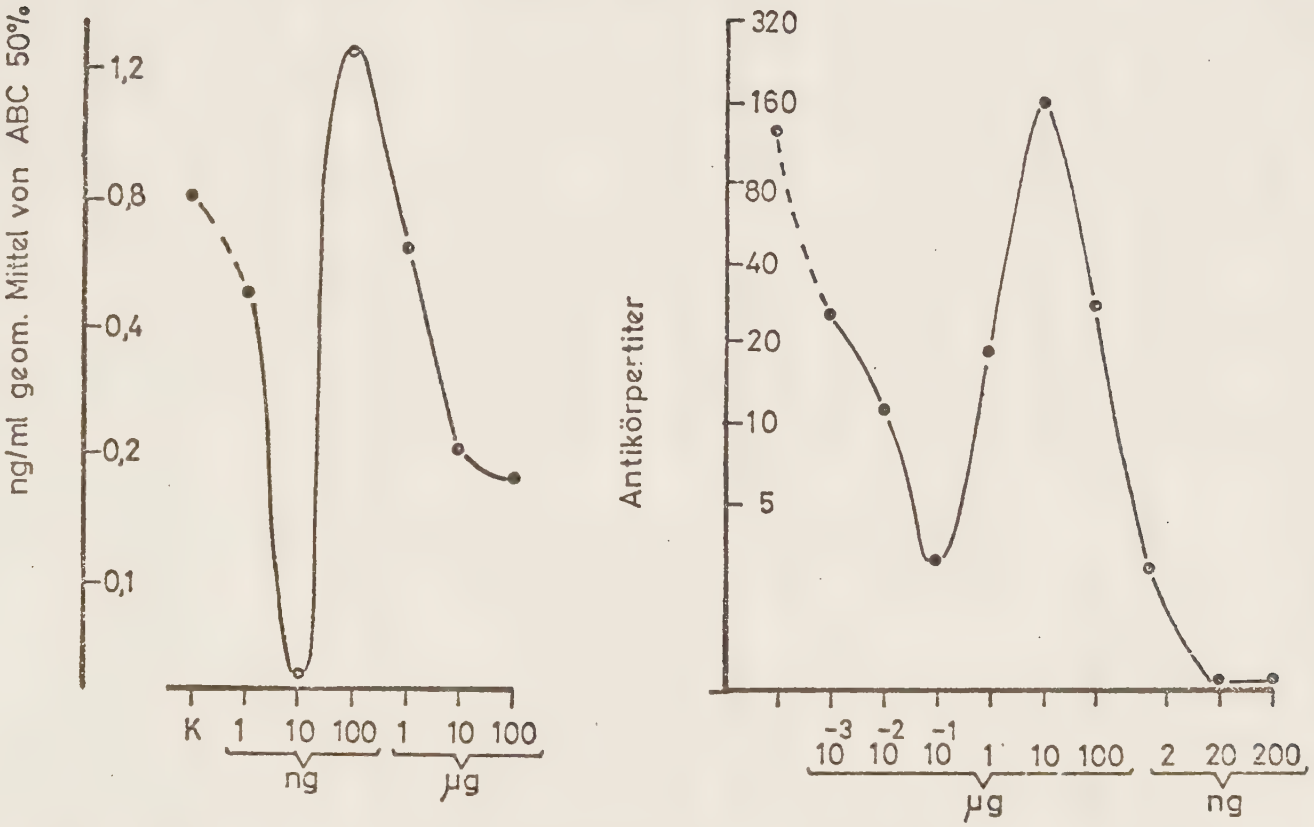


Abb.: 27

Vergleich der Hoch- und Niedrigdosistoleranzzonen nach Immunisation mit 1 mal krist. Insulin (linke Abb.) mit jenen nach Flagellin, einem Bakterienprotein aus Salmonella adelaide. (Umzeichnung nach SHELLAM und NOSSAL 1968)

sehr auffällig. Während Flagellin die Toleranz bereits nach 2 Wochen Immunisation erreicht hatte, benötigte Insulin 2 Monate. Für diese Verschiebung der Immunantwort in Dosis und Zeit können 3 Ursachen verantwortlich sein:

1. Das Lebensalter beider Tierarten war sehr verschieden. Die Ratten waren noch im Neugeborenenalter, als ihr Immunsystem noch sehr unreif war, während die NMRI-Mäuse ein voll ausgereiftes Immunsystem besaßen.

2. Die Immunogenität von Flagellin und Insulin kann sehr unterschiedlich sein. Flagellin ist ein starkes und Insulin ein sehr schwaches Immunogen (NOSSAL et al. 1965, HUMPHREY und WHITE 1964). Hieran dürften zwei Eigenschaften beteiligt sein. Insulin hat nur ein kleines Molekulargewicht von 6 000, Flagellin dagegen 40 000. Außerdem dürfte Flagellin für das tierische Immunsystem ein völlig fremdes Antigen sein, während Insulin mit dem körpereigenen Insulin eine starke Kreuzreaktion besitzt. Nur drei der 51 Aminosäuren des Insulins sind unterschiedlich zwischen dem als Antigen benutzten Schweineinsulin und dem eigenen Insulin der Maus (MARKUSSEN 1971, Abb. 28).

3. Die Speziesunterschiede von Ratte und Maus können ebenfalls eine Rolle spielen, indem sie sich in einer verschiedenen genetischen Veranlagung für die Immunreaktion ausdrücken.

KERP et al. (1969) haben mit Insulin eine Niedrigdosistoleranz am Meerschweinchen erzeugen können. Umgerechnet in Dosis pro kg/Körpergewicht wurde sie mit 2 µg/kg beim Meerschweinchen erreicht, was sehr gut zu unserer Niedrigdosistoleranz bei 3 µg/kg an der Maus paßt. Die Antikörperproduktion des Meerschweinchens bei einer Immunisation mit 20 µg/kg ohne Adjuvans ist ebenfalls jener der Maus bei 30 µg/kg sehr ähnlich.

3. Immunmodell für 1 mal krist. Insulin

Die Abhängigkeit der Toleranzentstehung von der Dosis und der Dauer der Immunisationen ohne Adjuvans ließ sich am besten, wie

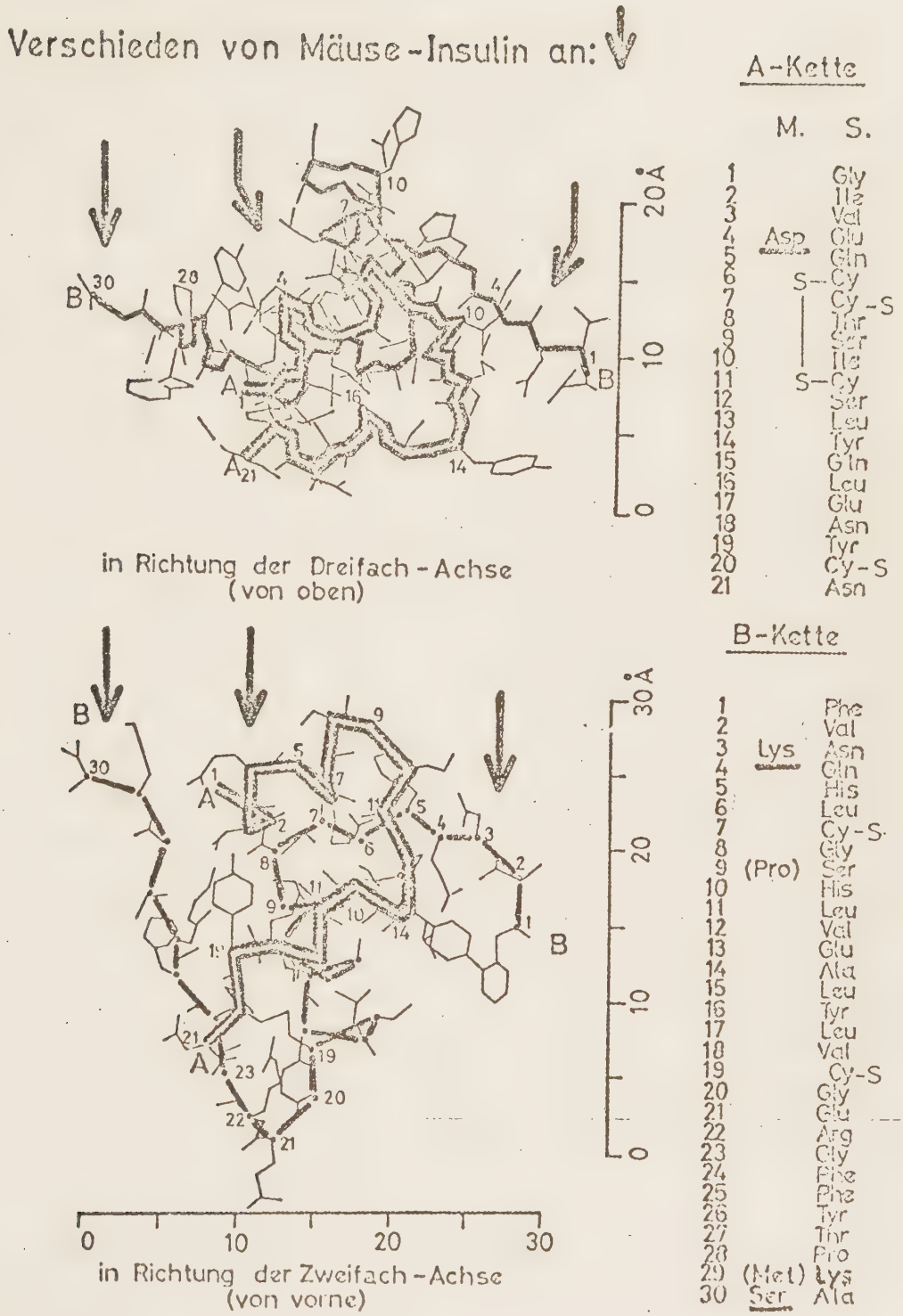


Abb.: 28

Kristallstruktur von Schweineinsulin (umgezeichnet nach BLUNDELL et al. 1971, Nature 231, 506-511). Die Unterschiede der Primärstruktur des Mäuseinsulins (M) im Vergleich zum Schweineinsulin (S) sind auf der rechten Seite wiedergegeben und in der Kristallstruktur des Schweineinsulins durch Pfeile gekennzeichnet (MARKUSSEN 1971).

von MITCHISON (1964) eingeführt, in einem Isoimmundiagramm für Insulin darstellen (Abb. 29). Die Art der Berechnung der Oberfläche des Immunmodells wurde von MITCHISON (1968) übernommen und als dreidimensionales Gebilde von Herrn Dr. Szymanski aus dem Rechenzentrum in Düsseldorf maschinell aufgezeichnet (Abb. 31). Da ein Teil der Individualproben verschüttet worden war und nur noch die Individualproben nach einem und nach zwei Monaten Immunisation vorlagen, wurde das Immunmodell nur aus den arithmetischen Mitteln der Mischseren berechnet. Einzelne besonders hochtitrige Antikörper von Einzeltieren können aber in einem Poolserum zu überbewertet hohen Titern führen, wie der Vergleich der Poolwerte mit den geometrischen Mitteln (Abb. 9 und 12) veranschaulichte. Dem entspricht, daß die Stimulationszonen mit den geometrischen Mitteln wegen der hohen Streuung nicht statistisch zu sichern waren und daher auch die Stimulationszonen des Immunmodells nicht verwertet werden konnten. Dagegen waren die Toleranzzonen mit geometrischen Mitteln der Einzelwerte statistisch zu sichern. Das Fehlen einer Antikörperbildung wurde auch von Poolwerten ziemlich verläßlich wiedergegeben, da sich niedrige Poolwerte den geometrischen Mitteln stark angli chen. Die aus den Poolseren berechneten Toleranzzonen konnten daher eine Tendenz zur Toleranz wiedergeben. In dieser Weise wurde das Immunmodell zur Veranschaulichung der Entwicklung von Toleranzzonen als durchaus brauchbar angesehen, wobei der Grad der Toleranz allerdings durch die Mischseren überbewertet wurde. Der Beweis für die Existenz der Toleranzzonen wurde dagegen durch die statistisch signifikanten Werte der geometrischen Mittel nach zwei Monaten Immunisation erbracht.

Das Immunmodell von 1 mal krist. Insulin ähnelt demjenigen von Albumin (MITCHISON 1968). Beide Antigene erzeugen zwei Toleranzzonen,eine im Hochdosisbereich und eine im Niedrigdosisbereich (Abb. 29).

Die Dosen der Hochdosistoleranz mit Insulin waren etwa 1 000 - fach niedriger als jene mit Albumin. Auch auf molarer Basis

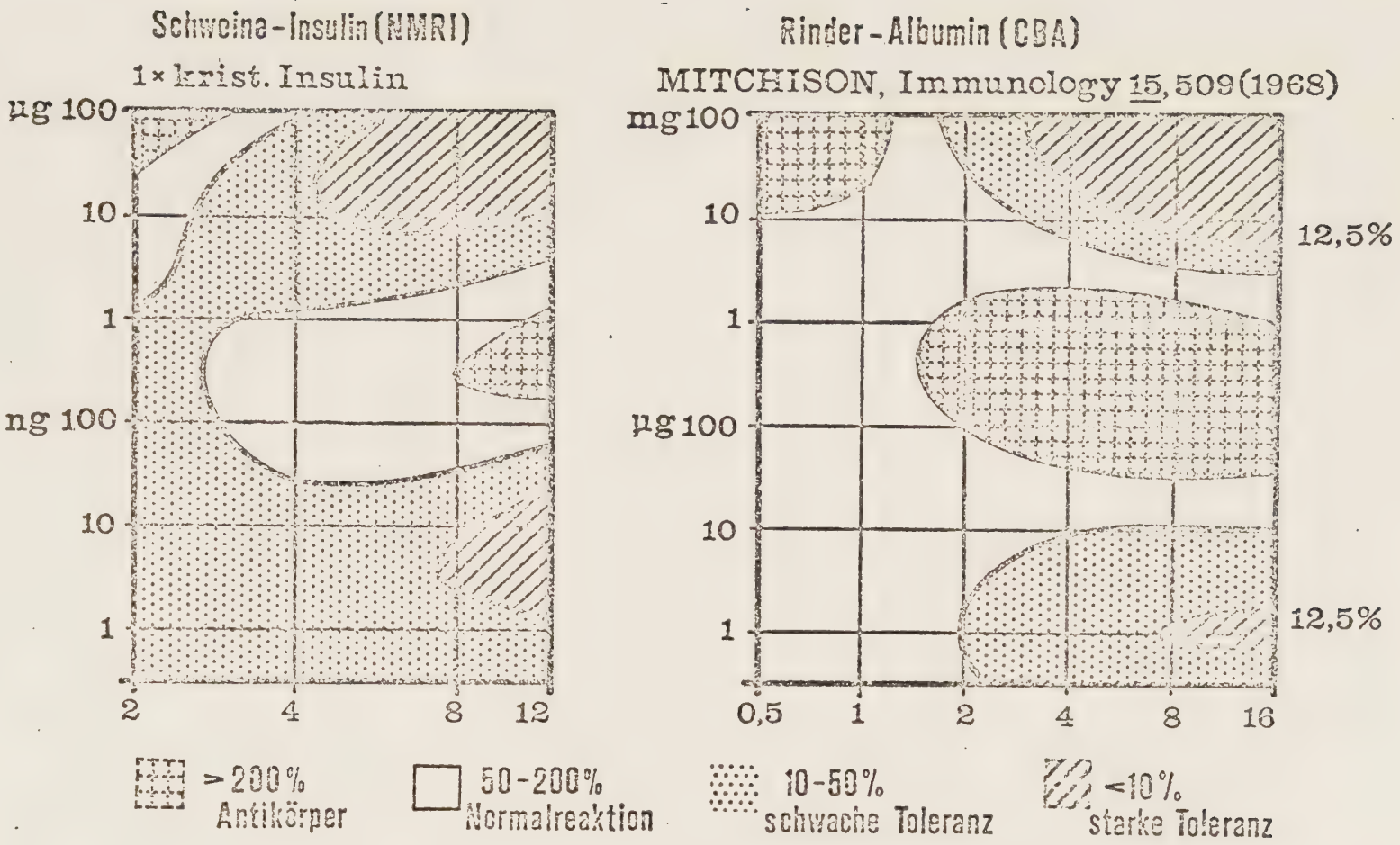


Abb.: 29

Vergleich des Isoimmundiagramms für 1 mal krist. Insulin mit dem Isoimmundiagramm für Albumin von MITCHISON.
(Umzeichnung nach MITCHISON 1968)

war der Unterschied sehr groß: 150 nM/Tier mit Albumin und 2 nM/Tier mit Insulin. Albumin benötigte zu der Antikörperstimulation mindestens 100 ug (1,45 nM/Tier),Insulin aber nur 1 ug (0,17 nM/Tier). Auch bei der Niedrigdosistoleranz waren die jeweils untersten Dosen für beide Antigene auf Gewichtsbasis und auf molarer Basis unterschiedlich, nämlich 1 ug für Albumin und 10 ng für Insulin (14,5 pM bzw. 1,7 pM). Da aber kristallines Insulin etwa 10 % an höhermolekularen Verunreinigungen enthielt, die antigenetisch mit Insulin verwandt sind, wie dimere, oligomere oder polymere Insuline, konnte es streng genommen nicht auf molarer Basis mit Albumin verglichen werden. Die Immunisationsdauer, um eine Toleranz oder eine Stimulation zu erreichen, war mit Insulin um mehr als das Doppelte länger als mit Albumin. Daher schien sich anzudeuten, daß das Insulinmolekül trotz seiner schnellen Abbaugeschwindigkeit im Blutkreislauf mit einer Halbwertszeit von etwa 30 Minuten (GRODSKY und FORSHAM, 1966) geringere Dosen aber längere Immunisationszeiten für alle Immunreaktionen als das Albuminmolekül benötigte. Neben dem 10-fach kleineren Molekulargewicht konnten auch die genetischen Unterschiede zwischen NMRI-Mäusen und CBA-Mäusen hierfür verantwortlich sein.

4. Beurteilung der Versuchstiere

Eine große Schwierigkeit bei der Durchführung des Toleranzversuches bestand darin, eine Mäuselinie zu finden, die hohe Insulinantikörpertiter ohne starke individuelle Schwankungen produzierte. CBA-Mäuse von Bar Harbor (USA) erzeugten ebenso wie CBA-Mäuse von Mill Hill (London), die von MITCHISON (1964) für das Immunmodell von Albumin verwandt worden waren, und C_{57} BL-Mäuse von Bar Harbor keine Insulinantikörper nach einmaliger Immunisierung mit Schweine-Insulin. Auch andere Mäuselinien waren dafür bekannt, schlechte Antikörperbildner gegen Insulin zu sein (KERP pers. Mitteilung). Daher blieb uns zunächst nur die Möglichkeit NMRI-Mäuse aus einer hiesigen Koloniezucht zu nehmen, die zwar hohe Antikörpertiter bildeten, aber heterogen reagierten.

Trotz der heterogenen Reaktion der NMRI-Mäuse ergaben sich aber auffallende Ähnlichkeiten zwischen den Reaktionsmodellen für Insulin und für Albumin von MITCHISON (1968) (Abb. 29). Außerdem zeigte sich eine gute Kontinuität in der zeitlichen Entwicklung der Toleranz und der Stimulation, obwohl für die verschiedenen Immunisationsperioden jeweils andere Tiere verwandt worden waren. Eine sehr gute Kontinuität fand sich ebenfalls vor der Testimmunisation, d.h. während der Immunisation ohne Adjuvans, da nach verschiedenen Immunisationszeiten nur die Dosis von 1 µg Antikörper produzierte, obwohl für jede Immunisationszeit 10 andere Tiere verwandt worden waren (Abb. 15). Zur Aufstellung des Immunmodells für Insulin wäre ein auf Insulin ansprechender, homogen reagierender Mäuseinzuchtstamm besser gewesen, wenn auch, wie später festgestellt wurde, bei diesen noch erhebliche Unterschiede in der Immunantwort bestehen. Die heterogen reagierenden NMRI-Mäuse kommen jedoch den genetisch sehr heterogenen Verhältnissen beim Menschen näher, und lassen daher vermuten, daß es auch beim Menschen möglich sein sollte, eine Insulintoleranz zu erreichen.

b) MC-Insulin

MC-Insulin (Monokomponent-Insulin) ist ein durch Gel- und Ionenaustauscher hochgereinigtes Insulin, das bis auf Spuren von Unreinheiten nur noch das reine Sangersche Insulin enthalten dürfte und daher ein einheitliches Antigen des Molekulargewichts von etwa 6 000 darstellt. Der Vergleich mit den Immunreaktionen nach 1 mal kristallisiertem Insulin gibt Hinweise auf die Bedeutung von Unreinheiten des Insulins.

1. Immunogenität

MC-Insulin, welches ohne Adjuvans 3 mal pro Woche 3 Monate lang Mäusen injiziert wurde, erzeugte bei der gleichen mittleren Dosis von 1 µg wie 1 mal krist. Insulin nur sehr geringe Antikörpertiter von $10^{1,6232}$ pg/ml ABC 50 %, die nur etwa 4 mal die methodisch bedingte Nachweisempfindlichkeit überschreiten. Die Antikörper waren spezifisch gegen Insulin gerichtet, da sie mit

nicht markiertem Insulin vollständig absorbiert werden konnten. Daher wurden mit MC-Insulin auch nach 3 monatiger Immunisation nur sehr geringe Antikörpertiter erzeugt. Der Zeitraum zwischen dem Immunisationsbeginn und dem ersten Auftreten von Antikörpern ist im Vergleich zu 1 mal krist. Insulin um 1 - 2 Monate verlängert.

Nach einer Kurzimmunisation von 2 Wochen mit der höchsten Dosis von 100 ug/Maus ohne Adjuvans entstanden ebenfalls geringe Antikörpertiter, die nach längerer Immunisation aber wieder verschwanden und, wie mit der Testimmunisation dargestellt, durch eine Toleranz abgelöst wurden. Die schwache Antikörperbildung nach MC-Insulin scheint jener nach 1 mal krist. Insulin zu entsprechen. Da diese höchste Dosis außerhalb des therapeutischen Bereiches liegt, können ähnliche Befunde beim Menschen nicht erwartet werden. Wegen der späten Antikörperbildung scheint MC-Insulin weniger immunogen als 1 mal krist. Insulin zu sein. SCHLICHTKRULL et al. (1969) hatten beim Kaninchen nach 6 monatiger Immunisation mit Schweineinsulin ohne Adjuvans keine Antikörper feststellen können. Jedoch ist das Kaninchen ein schlechterer Antikörperbildner als die Maus. Dies kann vielleicht darauf zurückgeführt werden, daß das als Antigen verwandte Schweineinsulin eine sehr hohe Ähnlichkeit mit dem eigenen Insulin des Kaninchens hat. Gegenüber autologem Insulin besteht eine natürliche Toleranz. Schweineinsulin hat im Vergleich zum autologen Insulin des Kaninchens nur eine andere Aminosäure in Position 30 der B-Kette (YOUNG 1962). Zwischen dem autologen Insulin der Maus und Schweineinsulin als Antigen finden sich schon 3 unterschiedliche Aminosäuren, und zwar in den Positionen 4 der A-Kette und 3 bzw. 30 der B-Kette (MARKUSSEN 1971, Abb. 28).

Daher ist es durchaus möglich, daß auch das hoch gereinigte MC-Insulin mit einem Molekulargewicht von 6 000 beim Kaninchen als auch bei der Maus immunogen ist, wenn auch wohl in unterschiedlichem Grade. Seine relativ schwache Immunogenität kommt allerdings ohne Hilfe von Adjuvans erst nach einer ge-

nügend langen Immunisation von mehreren Monaten mit der richtigen Dosis zur Geltung.

2. Bedeutung des Molekulargewichts

Antigene mit sich wiederholenden Untereinheiten wie Polysaccharide und Polypeptide sind von verschiedenen Autoren daraufhin geprüft worden, welches das geringste Molekulargewicht sei, welches noch Immunogenität besitzt. KABAT und BEZER (1958) fanden, daß Dextrane von 10 600 MG und darunter nicht mehr immunogen sind, wenn sie beim Menschen an zwei aufeinander folgenden Tagen injiziert werden. ANDERSSON (1969) berichtete, daß die Immunogenität von Polyvinylpyrrolidon ab einem MG von 10 000 und darunter verloren sei. Mit Polysacchariden stellten HOWARD et al. (1971) fest, daß Fraktionen mit einem Molekulargewicht von 4 000 nur noch schwach immunogen, höhere molekulare Fraktionen dagegen wesentlich immunogener seien. Mit Flagellin, einem Bakterienprotein, haben NOSSAL et al. (1965) den Einfluß des Molekulargewichtes untersucht. Polymerisiertes Flagellin ist wesentlich immunogener als monomeres mit einem MG von 40 000. Ein Fragment von Flagellin mit einem MG von 18 000 ist dagegen kaum noch immunogen, obwohl es alle wesentlichen antigenen Gruppen des Gesamtmoleküls enthält (PARISH und ADA 1969).

Das Molekulargewicht von MC-Insulin liegt in der Größenordnung jener MG bei anderen Antigenen, die nicht mehr immunogen sind. Dem entspricht, daß auch nach kurzer Immunisation mit Insulin in mittleren Dosen bei der Maus keine Antikörper entstanden sind. Nur nach einer Langzeitimmunisation von 3 Monaten fand sich ein sehr geringer Antikörpertiter. Wenn monomeres Insulin höhermolekulare Fraktionen enthielt, wie 1 mal krist. Insulin, wurden die Antikörper in einer kürzeren Zeit produziert.

Daher bestand bei der Maus insofern eine geringere Immunogenität des MC-Schweineinsulins als es erst nach einer längeren Zeit zur Antikörperbildung geführt hat, wenn es ohne Freundsches Adjuvans appliziert wurde. Daraus kann allerdings nicht

geschlossen werden, daß die Antikörpertiter nach einer entsprechend längeren Immunisation weniger hoch ansteigen würden. Bei z.Z. durchgeführten Immunisationen von B10.D2-Mäusen entweder mit 1 mal krist. Schweineinsulin oder mit MC-Schweineinsulin, jedoch diesmal in komplettem Freundschen Adjuvans, fand sich nach MC-Insulin weder eine Verzögerung der Antikörperbildung noch eine Verringerung der Antikörpertiter (JANSEN, KIESEL 1975, in Vorbereitung).

3. Klinische Bedeutung

Bei der therapeutischen Anwendung des MC-Insulins oder anderer hochgereinigter Insuline beim Diabetiker hat sich bisher noch keine einheitliche Meinung über deren Immunogenität herausgebildet. Anfänglich fand man nach einer Behandlung mit MC-Schweineinsulin keine Antikörperbildung mehr (SCHLICHTKRULL et al. 1969 und 1972, FANKHAUSER und MICHL 1971). Danach berichteten LEVETT und KORP (1972) und KÜHNAU (1972) über geringe Antikörpertiter nach 2 - 6 Monaten Insulinbehandlung. ROOT (1973) hatte mit dem hochgereinigten Schweineinsulin von LILLY gefunden, daß es zwar noch Antikörper erzeugt aber doch signifikant weniger als ein mehrfach krist. Schweineinsulin. Hier wurde dem hochgereinigten Insulin zwar noch eine geringere Immunogenität zuerkannt, aber der Unterschied zu mehrfach kristallisiertem Insulin war nur noch sehr gering. Dafür wurde allerdings beobachtet, daß die Lipodystrophie nach hochgereinigten Insulinen wesentlich weniger häufig auftrat.

KERP et al. konnten 1970 nachweisen, daß das in kommerziellem Insulin vorhandene Proinsulin nicht allein für die Immunogenität dieser Insuline verantwortlich zu machen ist. Auch fand KERP (1973) keine signifikanten Unterschiede nach einer Behandlung von Diabetikern mit CS-Insulin oder mehrfach krist. Insulin. FEDERLIN et al.(1974) wiesen daraufhin, daß hochgereinigte Insuline weniger Allergien erzeugten als mehrfach kristallisierte Insuline. Während man in den zitierten Ar-

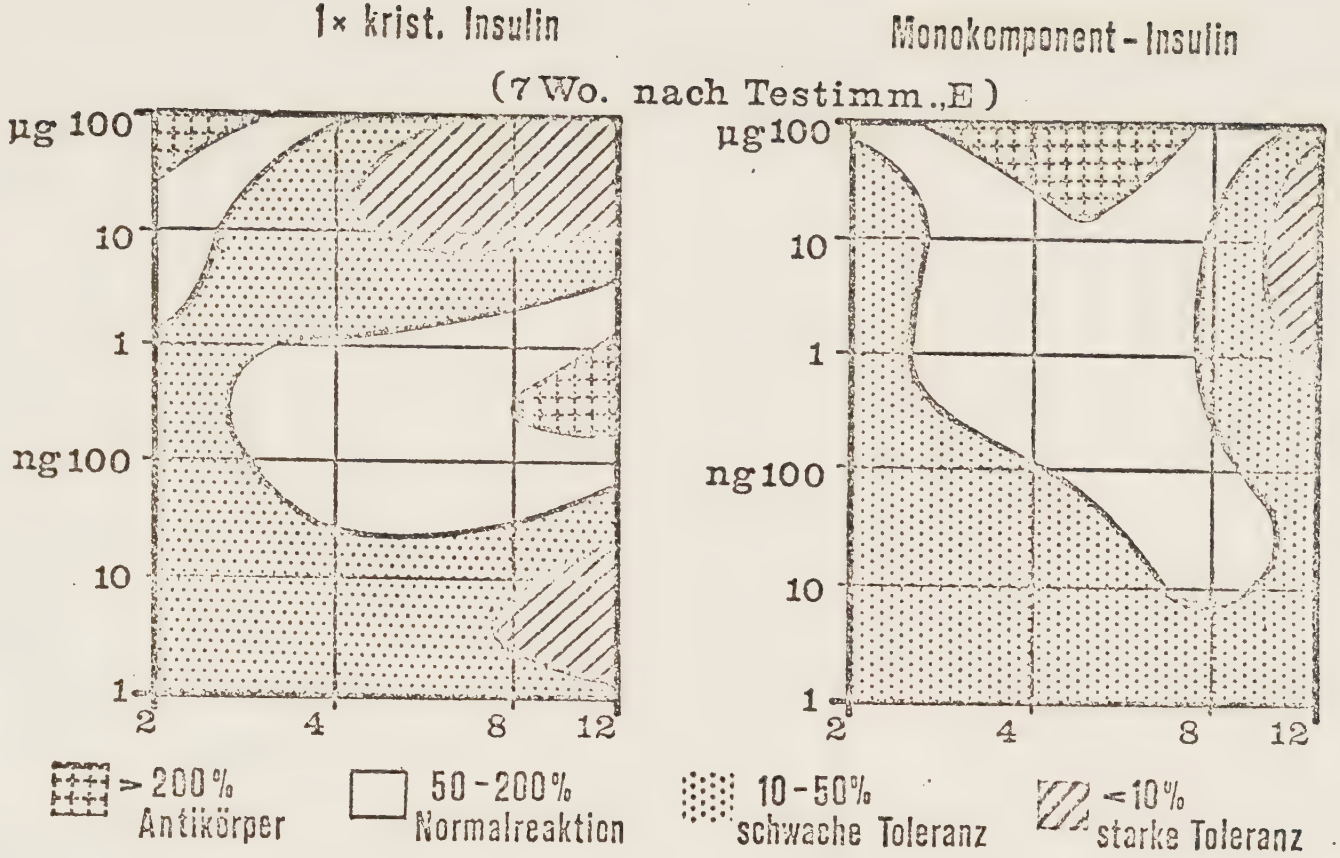


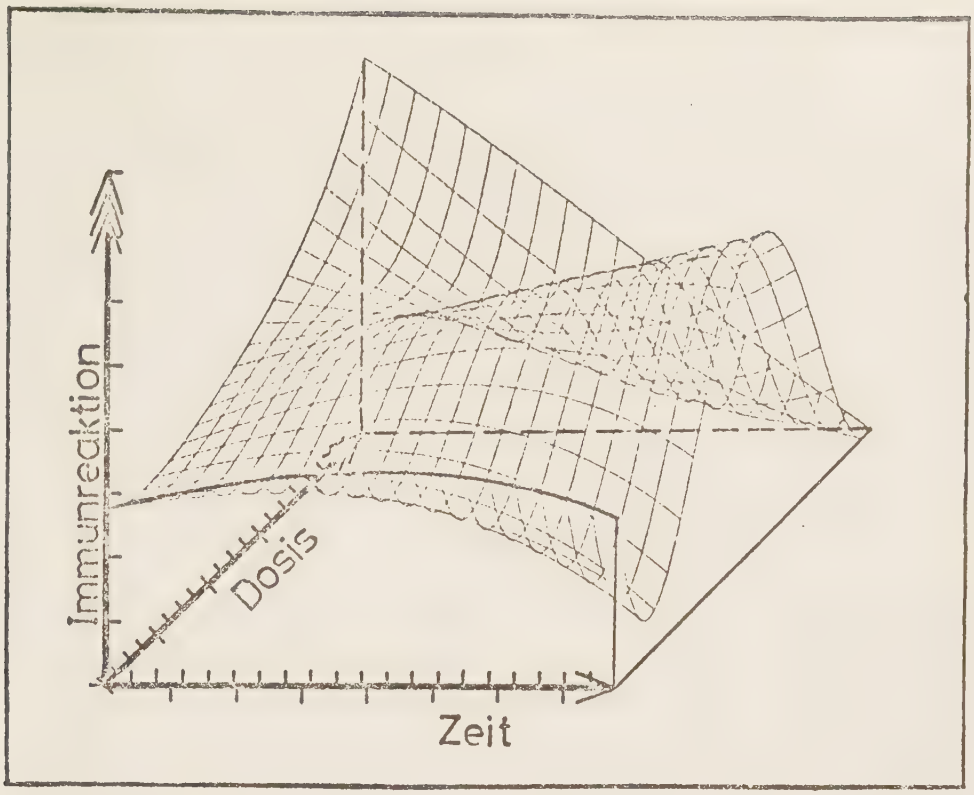
Abb.: 30

Vergleich der Isoimmundiagramme für 1 mal krist. Insulin (linke Abb.) und für MC-Insulin (rechte Abb.) zum Zeitpunkt 7 Wochen nach der Testimmunisation.

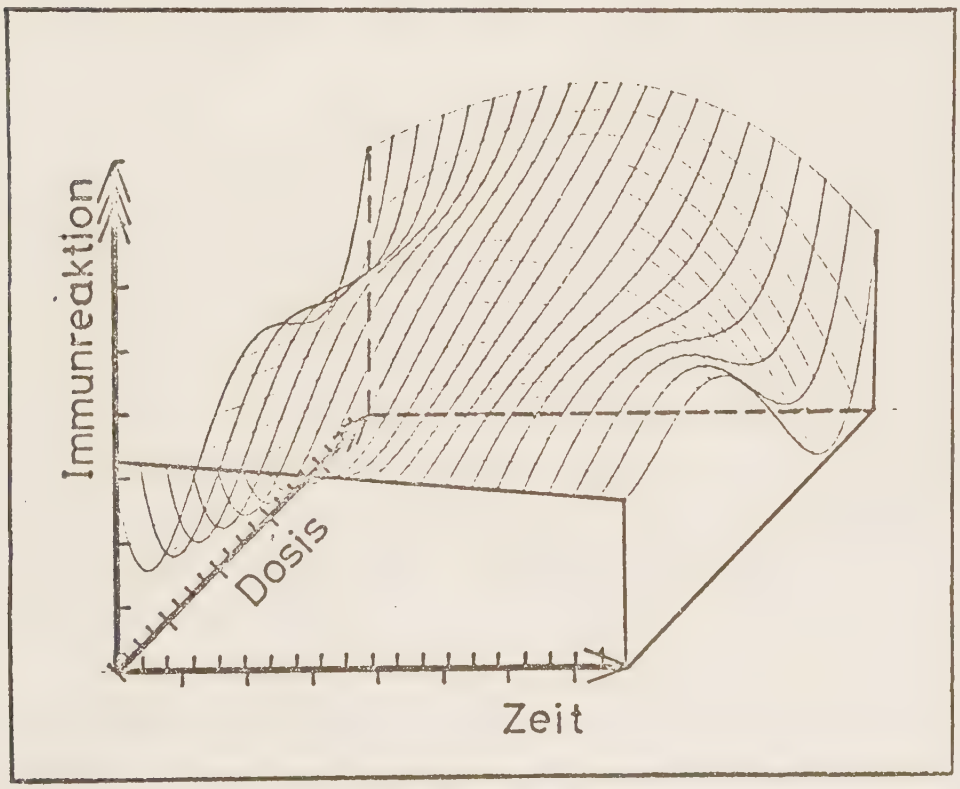
beiten die geringere Immunogenität nur mit Schweineinsulin gefunden hatte, wurde festgestellt, daß Rinderinsulin beim Menschen stärker immunogen wirkt und seine Reinigung sich kaum auf die Immunogenität auswirkt. Insbesondere konnte KERP (1973) in einer sehr breit angelegten klinischen Untersuchung nachweisen, daß krist. Rinderinsulin und chromatographiertes CR-Rinderinsulin nicht zu signifikant unterschiedlichen Antikörpertitern führten. Zur Zeit werden Untersuchungen durchgeführt, die darauf hindeuten, daß die Antikörperbildung gegenüber Insulin bei der Maus und beim Menschen genetisch eng mit Histokompatibilitätsantigenen assoziiert sind (JANSEN und KIESEL 1975; BERTRAMS et al. 1975). Dies könnte die bisherigen Befunde am Menschen neu zu deuten helfen.

4. Tolerogenität und Immunmodell für MC-Insulin

Trotz seiner geringen Immunogenität kann Insulin eine hohe Tolerogenität besitzen. Beide Eigenschaften lassen sich deutlich von einander unterscheiden. Bei fehlender Immunogenität müßten in einem Immunmodell die Stimulationszonen fehlen, da die Experimentaltiere nicht in der Lage wären, mehr Antikörper als die positiven Kontrollen zu bilden. Bei fehlender Tolerogenität dagegen würden in einem Immunmodell alle Toleranzzonen fehlen, da dieses Mal die Experimentaltiere nicht mehr in der Lage wären weniger Antikörper als die positiven Kontrollen nach der Testimmunisation in komplettem Freundschen Adjuvans zu erzeugen. Die positiven Kontrollen stellen jeweils die Immunantwort von nicht vorbehandelten Normaltieren nach einer Testimmunisation dar. Die in dem Immunmodell mit kristallinem und auch mit MC-Insulin dargestellten Stimulationszonen (Abb. 30) konnten mit geometrischen Mittelwerten wegen der großen Streuung statistisch nicht gesichert werden. Mit Tieren, welche homogener reagieren, würde man sie aber wahrscheinlich darstellen können, und es ist zu vermuten, daß neben 1 mal krist. Insulin auch MC-Insulin eine Stimulation bei hohen Dosen erzeugen kann, welche aber erst später eintritt und daher eine geringere Immunogenität anzudeuten scheint. Die von der Immunogenität unabhängigen



Berechnung und Zeichnung der Oberfläche des Immunmodells für 1 mal krist. Insulin



Berechnung und Zeichnung der Oberfläche des Immunmodells für MC - Insulin

Abb.: 31

tolerogenen Eigenschaften konnten dagegen statistisch signifikant nachgewiesen werden. Es fanden sich Toleranzzonen im Hochdosisbereich bei 10 µg für 1 mal kristallisiertes Insulin nach einer Immunisationszeit von 2 Monaten und für MC-Insulin nach 3 Monaten. Im Niedrigdosisbereich lagen die Zonen für beide Chargen bei 10 ng nach 2 Monaten Immunisation (Abb. 30). Die Oberfläche des dreidimensionalen Immunmodells für MC-Insulin wurde von Herrn Dr. Szymanski aus dem Rechenzentrum maschinell aufgezeichnet (Abb. 31).

Die Abhängigkeit der Tolerogenität von dem Molekulargewicht wurde von HOWARD et al.(1971) mit Polysacchariden untersucht. Es fand sich ein paralleles Verhalten der Immunogenität und der Tolerogenität, beide nahmen ab, wenn das Molekulargewicht geringer wurde. Ein Fragment von 4 000 MG hatte kaum noch Immunogenität und Tolerogenität. Im Gegensatz dazu fanden PARISH und ADA (1969), daß ein Fragment von Flagellin von nur 18 000 MG zwar kaum noch Immunogenität aber eine erhöhte Tolerogenität besitzt. Die Befunde mit Insulin haben Ähnlichkeit mit den beiden oben genannten Befunden. Die Tolerogenität von Insulin ist insofern vermindert, als sie mit MC-Insulin eine längere Immunisationsdauer benötigt, 3 Monate statt 2 Monate. Andererseits ließ sie sich aber mit 10-fach niedrigeren Dosen erzeugen, so daß man in Bezug auf die Dosis von einer erhöhten Tolerogenität sprechen könnte (Abb. 30). Es finden sich ebenfalls Parallelen zu den Arbeiten von DRESSER (1962) mit γ-Globulin und von FREI et al. (1965) mit Albumin. Beide Autoren fanden, daß die Abtrennung von höhermolekularen, in diesen Fällen aggregierten Bestandteilen ihres Antigens die Tolerogenität erhöhte. Mit γ-Globulin wurde sogar ein vollständiges Verschwinden der Immunogenität festgestellt, wenn es ohne Adjuvans gegeben wurde.

c) Insulitis

Als Insulitis wird die zelluläre Infiltration der Inseln des Pankreas mit Lymphozyten bezeichnet (von MEYENBURG, 1940). Im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit war es nicht möglich

gewesen, den zellulären Charakter dieser Immunreaktion im Sinne einer verspäteten Reaktion nachzuweisen. Es fehlten uns die Methoden zur Abgrenzung der antikörperbildenden Zellen von sensibilisierten Lymphozyten der Spätreaktion. Das Fehlen von Plasmazellen spricht jedoch mehr für ein Überwiegen der zellulären Reaktion. Daher übernehmen wir in diesem Punkt zunächst die in der Literatur zu findende Auffassung der Insulitis als einer zellulären Immunreaktion (FREYTAG 1972).

Die Insulitis kommt beim Menschen vor allem bei jugendlichem Diabetes vor und wurde von GEPTS (1965) bei 68 % der Patienten gefunden, die kurz nach dem klinischen Beginn der Krankheit verstarben. Ähnliche histologische Befunde wie beim Menschen konnten von MÜNTEFERING et al. (1970 und 1971) bzw. MÜNTEFERING (1972) durch Virusinfektionen an der Maus erzeugt werden. Aber auch die Immunisation verschiedener Spezies mit Insulin führte zum Auftreten einer Insulitis, jedoch mit einem anderen zeitlich protrahierteren Ablauf. So erzeugten RENOLD et al. (1964) beim Rind, TORESON et al. (1964) und KLÖPPEL et al. (1972) am Kaninchen und FEDERLIN et al. (1968) am Schaf eine Insulitis durch aktive Immunisation mit Insulin in Freundschem Adjuvans.

Obgleich die Versuchsanordnung in dieser Arbeit darauf ausgerichtet war, eine Toleranz zu erzeugen, wobei die Bedingungen für die Entstehung einer Insulitis nicht ideal waren, wurden mehrfach Insulitiden festgestellt (FREYTAG, JANSEN, KLÖPPEL 1973). Immunisationen zuerst ohne und dann mit Freundschem Adjuvans hätten eher zur Immundeviation ohne zelluläre Reaktion führen sollen. (Immundeviation ist der von ASHERSON eingeführte Begriff für eine partielle Toleranz, die nur die Spätreaktion und die Antikörperbildung vom IgG-Typ umfaßt.) Bei 14 von 87 Tieren, und zwar nur in bestimmten Dosisgruppen, wurde die Insulitis gefunden. Die 8 Kontrolltiere, welche in gleicher Weise wie die Experimentaltiere die Testimmunisation mit der Höchstdosis von einmal krist. Insulin erhalten hatten, zeigten keine Insulitis, so daß die Testimmunisation nicht als Ursache für die Insulitis

angesehen werden kann sondern nur die vorausgehende Immunisationsperiode. Die Tatsache, daß die Testimmunisation trotz des kompletten Freundschen Adjuvans keine Insulitis ausgelöst hatte, erlaubte es erst, die Befunde der Experimentaltiere auszuwerten.

An der Maus war bisher noch keine Insulitis durch aktive Immunisation beschrieben worden, obwohl der Versuch dazu gemacht worden war (FREYTAG pers. Mitteilung). Unsere Versuche bestätigen diese Schwierigkeit, da die Insulitis nur nach besonders niedrigen Dosen von 1 - 10 ug 1 mal krist. Insulin auftrat. Der histologische Aspekt war auch anders als beim Kaninchen und beim Rind, möglicherweise wegen anderer anatomischer Verhältnisse, denn die lymphozytären Infiltrate traten hauptsächlich peri-insulär auf. Der zytologische Charakter der Insulitis war weitgehend identisch in den drei Spezies.

1. Einfluß der Insulincharge

Besonders auffallend an unseren Befunden war die Tatsache, daß die Insulitis mit 1 mal krist. Insulin nur bei ganz kleinen Dosen und mit MC-Insulin nur bei hohen Dosen auftrat (Abb. 20). Diese starke Abhängigkeit von der Dosis und der Insulincharge scheint auszuschließen, daß die Insulitis in unserem Versuch eine unspezifische Veränderung aufgrund der häufigen i.p. Injektionen oder des Freundschen Adjuvans darstellt. Sie scheint vielmehr eine immunologische Reaktion zu sein, die bei einer bestimmten Dosis ihr Optimum erreicht und bei höheren Dosen bereits zu einer immunologischen Toleranz führt. Daher halten wir das Fehlen der Insulitis bei den hohen Dosen von 1 mal krist. Insulin für eine Hochdosistoleranz gegenüber dem zellulären Phänomen der Insulitis.

In der Literatur (RENOLD et al. 1964, TORESON et al. 1964 und FEDERLIN et al. 1968) wird das Insulin selbst für die Insulitis verantwortlich gemacht. Wenn das wahre Sangersche Insulin die alleinige Ursache wäre, würde man die Insulitis

sowohl nach 1 mal krist. Insulin als auch nach MC-Insulin bei etwa der gleichen Dosis erwarten. 1 mal krist. Insulin müßte sogar eher noch höhere Dosen benötigen, da es wegen der Unreinheiten nur etwa 80 % an reinem Sangerinsulin enthält. Die Ergebnisse zeigen jedoch deutlich, daß gerade umgekehrt, das reine MC-Insulin die hohen Dosen erforderte. Daher liegt die Vermutung nahe, daß das reine Sangersche Insulin (welches der von Sanger aufgestellten Formel vollständig entspricht) nicht alleine für die Insulitis verantwortlich zu machen ist.

Folgende erste Hypothese ist wahrscheinlicher: 1 mal krist. Insulin enthält ein kontaminierendes Antigen, welches die Insulitis erzeugt. Dieses Antigen wurde durch Chromatographie bei der Isolierung des MC-Insulins abgetrennt, blieb aber noch in geringen Mengen von etwa 1/1000 in diesem erhalten. Um mit dem kontaminierenden Antigen nach der Chromatographie die notwendigen optimalen Dosen zu erreichen, waren jetzt etwa 1000-fach höhere Dosen erforderlich.

Eine zweite Hypothese würde annehmen, daß das Sangerinsulin eine ihm eigene Fähigkeit besitzt, die Insulitis zu erzeugen, wie dies mit MC-Insulin gezeigt worden war. Ein kontaminierendes Antigen, welches in einmal krist. Insulin vorhanden ist, könnte potenzierend wirken, so daß mit dessen Hilfe wesentlich kleinere Insulindosen schon zur Insulitis und höhere bereits zu einer Toleranz gegenüber der Insulitis führen können.

Da bei der Maus und beim Kaninchen eine Insulitis durch Immunisation mit kristallinem Insulin erzeugt werden kann, sollte man erwarten, daß sie beim insulinbehandelten Diabetiker entstehen könnte. Tatsächlich fand man sie hauptsächlich bei unbehandelten, schnell verstorbenen jugendlichen Diabetikern (GEPTS 1965) und nur bei zwei Fällen von spätmanifestem Diabetes (LECOMPTE 1972). Die Tierexperimente an der Maus können das seltene Auftreten der Insulitis nach einer Insulinbehandlung erklären helfen.

Bei der Maus sind die Dosen, welche therapeutischen Dosen pro kg Körpergewicht beim Menschen entsprechen würden, nicht in der Lage, eine Insulitis zu erzeugen, wenn ein nur kristallisiertes Insulin verwandt wird. Mit hochgereinigtem Insulin haben jedoch diegleichen Dosen eine Insulitis bei der Maus erzeugt. Daher muß man jetzt, nach Einführung der hochgereinigten Insuline in die Therapie, darauf achten, ob die Insulitiden nicht nach einer Insulintherapie häufiger zu beobachten sein werden. Sie würden dann auf einer noch nicht ausreichenden Reinigung der Insuline beruhen.

2. Bedeutung der Insulinantikörper

Die immunologischen Befunde, vor allem die Beziehung der Insulitis zu Insulinantikörpern, können dazu herangezogen werden, das kontaminierende Antigen besser zu charakterisieren. Dieser für die Insulitis verantwortliche Faktor kann strukturelle Ähnlichkeit mit dem Sangerinsulin besitzen, wie Proinsulin, dimeres Insulin, polymeres Insulin und andere Derivate und daher selbst Insulinantikörper oder mit Insulin kreuzreagierende Antikörper erzeugen oder deren Produktion potenzieren. Wenn dieser Faktor aber keine strukturelle Ähnlichkeit mit Insulin besitzt und nur ein kontaminierendes Antigen aus dem Pankreas darstellt, würde er keine direkten oder kreuzreagierenden Antikörper produzieren. In unseren Befunden fehlen Hinweise dafür, daß das kontaminierende Antigen auch Insulinantikörper erzeugen kann (JANSEN, FREYTAG 1973).

1. Es besteht keine Korrelation zwischen dem Auftreten vom Insulitis und von Insulinantikörpern bei individuell untersuchten Mäusen.

2. Die Tiergruppe mit den höchsten, über 5 Monate anhaltenden Antikörpertitern gegen Insulin zeigte keine Insulitis, während andere Gruppen mit wesentlich weniger Antikörpern einen hohen Prozentsatz von Insulitiden aufwiesen.

Es ist jedoch möglich, daß komplexgebundene oder geringe Mengen hochaffiner Antikörper mit unseren Methoden nicht erfaßt worden sind, da uns keine auf zellulärer Basis aufgebaute Antikörpernachweismethode zur Verfügung stand. Da die zelluläre Immunreaktion, wie sie bei der Insulitis vorliegt, auf einem anderen Vorgang beruht als die humorale Reaktion der Antikörperbildung, wenn auch beide Immunreaktionen gegen das gleiche Antigen gerichtet sind, ist eine Dissoziation beider Vorgänge möglich. So ist z.B. bekannt, daß die zelluläre Reaktion durch Antikörper unterdrückt werden kann - Enhancement-Phänomen. WEIGLE (1971) zeigte nun, daß die zelluläre Reaktion, die durch thymusabhängige Lymphozyten (T-Zellen) bedingt ist, schneller und durch kleinere Dosen tolerant wird als die Antikörperbildung, an der im wesentlichen vom Knochenmark abhängige Lymphozyten (B-Zellen) beteiligt sind (CHILLER et al. 1971). Eine Hochdosistoleranz der B-Zellen, d.h. eine Toleranz des antikörperbildenden Apparates würde daher eine Toleranz der zellulären Reaktion einschließen. Bei der Dosis von 10 µg MC-Insulin wurde entsprechend den rein serologischen Kriterien von MITCHISON (1968) eine partielle Hochdosistoleranz der B-Zellen erreicht. Entsprechend WEIGLE (1971) wäre anzunehmen, daß dann die gegen Insulin gerichteten T-Zellen tolerant seien. Trotzdem fanden wir in dieser Dosis 2 von 9 Tieren mit einer Insulitis. Dies spräche mehr für die Hypothese, daß das für die Insulitis verantwortliche Protein antigenetisch von Insulin verschieden ist und möglicherweise ein unabhängiges Pankreasprotein darstellt. Wenn jedoch auf der zellulären Ebene keine Toleranz erreicht war, was wir nicht nachprüfen konnten, bleibt die Möglichkeit, daß die Insulitis durch ein modifiziertes Insulin erzeugt wurde.

d) Periduktulitis

Eine periduktuläre Infiltration wurde bei 32 % aller Tiere festgestellt. Die Kontrolltiere, welche nur eine Testimmunisation erhalten hatten, zeigten keine Periduktulitis wohl aber nach der zweiten Testimmunisation. Daher konnten

weiterhin nur die Experimentaltiere mit einer Testimmunisation für die Periduktulitis ausgewertet werden.

1. Einfluß der Insulincharge

Bei Tieren mit nur einer Testimmunisation war der Unterschied zwischen den beiden Insulinchargen besonders groß. Während 57 % der mit 1 mal krist. Insulin behandelten Tiere die Periduktulitis erzeugt hatten, fand sie sich nur bei einem signifikant niedrigeren Prozentsatz, nämlich 4,5 %, in der mit MC-Insulin behandelten Gruppe. Somit scheint hier das Sangerinsulin als Ursache ebenfalls nicht in Betracht zu kommen. Es muß vielmehr ein kontaminierendes Antigen angenommen werden, welches im Gegensatz zu dem für die Insulitis verantwortlichen Antigen fast vollständig durch Chromatographie von Insulin getrennt werden kann. Diese Tatsache spricht auch dafür, daß das für die Periduktulitis verantwortliche Antigen von jenem für die Insulitis verschieden sein muß. Während mit 1 mal krist. Insulin beide Veränderungen zumeist gleichzeitig auftraten, waren sie nach MC-Insulin vollständig dissoziiert, da die Periduktulitis praktisch nicht mehr auftrat.

2. Bedeutung der Insulinantikörper

Das Antigen der Periduktulitis hat nicht die Fähigkeit Antikörper gegen Insulin zu erzeugen.

1. Es findet sich keine Korrelation zwischen dem Auftreten der Periduktulitis und Insulinantikörpern bei individuell untersuchten Mäusen.
2. Die Tiergruppen mit den höchsten Insulinantikörpertitern haben nicht mehr Periduktulitiden als solche mit wenig oder keinen Antikörpern.
3. Tiere, die gegenüber Insulin tolerant sind und keine Insulinantikörper mehr erzeugen können, haben trotzdem eine Periduktulitis aufgezeigt.

Dies ähnelt den Befunden bei der Insulitis. Aber auch hier

ist es möglich, daß komplexgebundene oder sehr geringe Mengen an hochaffinen Antikörpern mit unseren Methoden nicht erfaßt wurden.

Zwei Befunde, die Dissoziierbarkeit der Periduktulitis und Insulitis und das Auftreten der Periduktulitis bei toleranten Tieren, machen die Hypothese sehr wahrscheinlich, daß das Periduktulitis-Antigen keine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Sangerinsulin besitzt, sondern eher eine Verunreinigung aus dem Pankreas darstellt.

e) Glucosetoleranz

Die Immunisierung von NMRI Mäusen mit 100 ug 1 mal krist. Insulin in komplettem Freundschen Adjuvans führte zu hoch pathologischen Werten der Glucosetoleranz (G.T.) 2 Stunden nach der Belastung. Da die Ausgangswerte vor der Glucosebelastung normal waren, lag bei diesen Tieren nur ein subklinischer (chemischer) Diabetes vor. Immunisierung mit dem gleichen Insulin aber ohne Adjuvans führte erst nach einer Langzeitimmunisation von einigen Monaten zu leicht pathologischen Werten, gerade oberhalb der 3 Sigma-Grenze normaler Mäuse.

1. Einfluß der Insulincharge

Pathologische Werte traten nach 1 x krist. Insulin unabhängig von der verwandten Insulindosis sowohl bei sehr hohen als auch bei sehr niedrigen Dosen auf, was auf die genetische Heterogenität der NMRI Mäuse deutet. Wurde statt des einmal krist. Insulins das MC-Insulin zur Langzeitimmunisation ohne Adjuvans angewandt, so entstanden keine pathologischen G.T.-Werte bei niedrigen Dosen, wohl aber bei hohen Dosen. Daher scheint die Chromatographie von 1 mal krist. Insulin einen Faktor zu verringern, welcher für die pathologische G.T. verantwortlich ist. Wäre das wahre Sangerinsulin allein verantwortlich, so hätte man umgekehrt erwarten müssen, daß MC-Insulin auch in niedrigen Dosen wirkungsvoll ist. Das

Sangerinsulin kann nur auf dem Wege über Antikörper gegen Insulin die G.T. beeinflussen.

2. Bedeutung der Insulinantikörper

Wenn aber Insulinantikörper für die pathologische G.T. verantwortlich zu machen sind, müßte auch eine positive Korrelation zwischen beiden bestehen. Die graphische Darstellung läßt aber keine Korrelation erkennen. Daher deuten alle Befunde, wie schon bei der Insulitis, darauf hin, daß ein von dem wahren Sangerinsulin verschiedenes Antigen auch für die pathologische G.T. verantwortlich sein könnte. Es scheinen aber auch die Faktoren, die für die Insulitis und die pathologische G.T. verantwortlich sind, voneinander verschieden zu sein, da sie keine Korrelation untereinander zeigen (V = 0,03). Das Ausmaß der Insulitis (etwa 10 % aller Inseln) wäre außerdem unzureichend, um die pathologische G.T. erklären zu können.

3. Hypothesen über vermutliche Faktoren

In welcher Weise kann die G.T. durch einen Faktor beeinflußt werden? Hier sind drei Möglichkeiten gegeben:

a) Der Faktor kann direkt ohne Mithilfe des Immunsystems auf den Glucosemetabolismus einwirken.
b) Er kann ein verändertes Insulin darstellen, welches wegen seiner Kreuzreaktion mit Insulin Insulinantikörper erzeugt und dadurch den Glucosemetabolismus stört.
c) Er kann ein von Insulin verschiedenes Antigen darstellen, z.B. ein im Glucosemetabolismus beteiligtes Enzym oder ein Insulinrezeptoranteil. Hiergegen werden Antikörper erzeugt, welche ebenfalls den Glucosemetabolismus stören.

ad a) Ein nicht immunologischer, direkt wirkender Faktor erscheint unwahrscheinlich, da die G.T. erst 11 und 13 Tage nach der letzten Immunisation geprüft wurde, zu einem Zeitpunkt also, wenn alle direkt wirkenden Proteine katabolisiert sein sollten. Auch eine Hemmung der Insulinfreisetzung nach einer 3 mona-

tigen hohen Substitution mit exogenem Insulin sollte 11 Tage später wieder kompensiert sein und würde auch nicht mit Dosen, die unterhalb physiologischer Dosen liegen, entstanden sein. In unserem Versuch fand sich die pathologische G.T. sogar mit Werten, die etwa 100-fach bis 1000-fach unter normalen Seruminsulinwerten lagen.

ad b) Antikörper gegen Insulin, die dessen biologische Aktivität neutralisieren, wurden seit langem angeschuldigt einen höheren Insulinbedarf des Diabetikers zu verursachen (u.a. BERSON, YALOW 1958, DITSCHUNEIT und FEDERLIN 1966, KERP et al. 1968). In unserem Versuch sprechen jedoch mehrere Befunde dagegen, daß alleine das wahre Sangerinsulin für die pathologische G.T. an der Maus verantwortlich wäre.

1. MC-Insulin war in niedriger Dosierung nicht in der Lage, eine pathologische G.T. zu erzeugen, wohl aber einmal krist. Insulin.
2. Es bestand keine Korrelation zwischen der G.T. und dem Titer der Insulinantikörper.
3. Eine pathologische G.T. zeigte sich bei Tieren ohne Insulinantikörper (vor Testimmunisation).
4. Tiere die gegenüber Insulin tolerant waren, hatten trotzdem eine pathologische G.T.

Wie bei der Insulitis können wir danach fragen, ob das vermutliche Antigen eine immunologische Kreuzreaktion mit Insulin besitzt, d.h. ihm strukturell ähnlich ist. Entsprechend der 1. Hypothese eines insulinähnlichen Antigens würde man annehmen, daß es die Immunogenität des Sangerinsulins potenziert und daher zu starken Insulinantikörpern führt. Die schlechte Korrelation mit Insulinantikörpern und deren Auftreten bei toleranten Mäusen würde diese Hypothese nur dann zulassen, wenn hochaffine oder komplexgebundene Antikörper hierfür verantwortlich sind und mit unserer Methode nicht erkannt wurden.

ad c) Die alternative Hypothese eines nicht mit Insulin kreuzreagierenden Antigens könnte die Befunde ebenfalls erklären. Es müßte sich dann um ein aus dem Pankreas stam-

mendes Enzym des Glucosemetabolismus oder um einen Rezeptor, z.B. einen Teil des Insulinrezeptores, handeln. Antikörper gegen solche Antigene, die mit den entsprechenden körpereigenen Antigenen kreuzreagieren, könnten den Glucosemetabolismus stören. Da das MC-Insulin in hoher Dosierung ebenfalls eine pathologische G.T. erzeugte, müßte es von diesem Antigen noch geringe Mengen enthalten haben. Die Existenz eines solchen Faktors in Konzentrationen unter 0,5 % der Insulinkonzentration ist nach SCHLICHTKRULL (1972)* nicht ausgeschlossen. Besonders immunogene Antigene könnten in solchen Konzentrationen noch wirksam sein. Falls es sich bei diesem Antigen um einen Teil eines Insulinrezeptors handeln würde, könnte seine hohe Affinität zum Insulinmolekül sehr leicht erklären, warum dieses Antigen so schwer von Sangerinsulin zu trennen war.

4. Hinweise aus der Literatur

Eine Bestätigung der Hypothese, daß das wahre Sangerinsulin nicht die alleinige Ursache einer pathologischen G.T. darstellt, findet sich bei SCHLICHTKRULL et al. (1969), der bei den mit dimerem Insulin immunisierte Kaninchen eine wesentliche Erhöhung des Nüchternblutzuckers fand, während Tiere, die mit MC-Insulin immunisiert waren, normale Werte aufwiesen. Außerdem waren die mit der Dimerfraktion behandelten Tiere im Gegensatz zu den anderen relativ insulinresistent geworden.

Die klinischen Erfahrungen mit insulinresistenten Patienten ergaben keine ausreichenden statistischen Korrelationen zwischen dem täglichen Insulinbedarf und Insulinantikörpern. Bei manchen Insulinresistenzen lassen sich keine Antikörper nachweisen (GRÜNEKLEE et al. 1971). Die höchste Korrelation zwischen Antikörpertiter und Insulinbedarf wurde von

---

*Diskussionsbemerkung auf dem Kongress der European Association for the Study of Diabetes, 1972, Madrid.

KERP et al. (1968) mit r = 0,533 für AK_1 + AK_2 bei 91 Patienten angegeben (Tabelle 10). Die hochaffinen Antikörper AK_1 alleine hatten eine etwas höhere Korrelation von r = 0,605. LEVETT (1972 pers. Mitteilung) fand bei 88 Patienten eine Korrelation von r = 0,41 und WALDHÄUSL et al. (1972) errechneten bei 299 Patienten nur r = 0,237. Selbst der höchste Korrelationskoeffizient von 0,6 für hochaffine Antikörper würde die Insulinresistenz nicht alleine durch Insulinantikörper erklären können. Ein zusätzlicher Faktor entweder nicht immunologischer Art (siehe VALLANCE-OWEN et al. 1958 oder GRÜNEKLEE et al. 1972) oder aber immunologischer Art, wie der hier postulierte, würde daher auch mit den klinischen Befunden zu vereinbaren sein.

Augenblicklich vermögen noch zwei Hypothesen unsere Befunde über die G.T. an der Maus zu erklären. Das für die pathologische G.T. verantwortliche Antigen ist wahrscheinlich nicht mit dem Sangerinsulin identisch, kann aber

a) diesem strukturell verwandt sein und mithelfen seine Immunogenität zu potenzieren. Hierbei wird vorausgesetzt, daß es sich nur um hochaffine oder komplexgebundene Antikörper handelt, die mit unseren Methoden nicht nachweisbar waren.

Es kann aber auch

b) ein strukturell von Insulin verschiedenes, nicht kreuzreagierendes Antigen aus dem Pankreas angenommen werden, welches z.B. ein Enzym des Glucosemetabolismus oder einen Teil des Insulinrezeptors darstellt. Hierzu würden unsere bisherigen Befunde besser passen.

Um die Frage nach dem verantwortlichen Antigen beantworten zu können, sind weitergehende Arbeiten mit den chromatographisch isolierten kontaminierenden Unterfraktionen des 1 mal krist. Insulins erforderlich.

Tabelle 10

Literaturangaben über die Korrelation von Insulin-antikörpern und dem täglichen Insulinbedarf

Autor	Anzahl d. Patient.	Korrelationskoeff.
KERP, L. et al. 1968	91	0,533 = $AK_1 + AK_2$ 0,605 = AK_1 0,33 = AK_2
LEVETT, R.E. et al. 1972 unveröffentl.	88	0,41 = IgG und IE/kg/Tag
WALDHÄUSL, W. et al. 1972	299	0,237 = IBK und IE/Tag

f) Zukunftsperspectiven

I. Strukturell "fremde" Insuline

Schweineinsulin ist sicherlich wesentlich weniger immunogen für den Menschen als Rinderinsulin, weil es bis auf eine Aminosäure mit menschlichem Insulin identisch ist. Die Bestände an Schweineinsulin dürften aber schon jetzt nicht mehr ausreichen, um den gesamten Insulinbedarf völlig zu decken. Daher ist auch jetzt schon Rinderinsulin für die Therapie der Diabetiker notwendig, obwohl es wesentlich mehr Antikörper erzeugt. Es ist von menschlichem Insulin stärker unterschieden, da hier 3 Aminosäuren ausgetauscht sind. Eine Reinigung des Rinderinsulins scheint nicht auszureichen, um die Antikörperproduktion beim Menschen signifikant zu erniedrigen. (KERP 1973, ROOT 1973). Noch fremder in seiner Struktur wäre ein synthetisches Insulin, welches innerhalb von 1 - 2 Jahrzehnten durch die pharmazeutische Industrie hergestellt wird. Denn um die Synthese zu vereinfachen und zu verbilligen, sollen nach Aussage von Dr. Geiger, Hoechst, alle für die biologische Wirkung nicht notwendigen Aminosäuren fortgelassen werden und außerdem schwierig zu verknüpfende Aminosäuren durch einfachere ersetzt werden, solange die biologische Aktivität nicht entscheidend gestört würde. Ein solches Insulin wäre sicher noch stärker von menschlichem Insulin verschieden als ein Rinderinsulin. Bei einer Therapie mit diesen strukturell stärker abweichenden Insulinen wäre es wichtig, zu Behandlungsbeginn eine immunologische Toleranz erzeugen zu können. Unser Versuch deutet an, daß bereits Dosen, die 10-fach höher liegen als therapeutische Dosen, eine Toleranz erzeugen können. Mit einem biologisch inaktiven aber immunologisch aktiven Insulinderivat wäre man in der Lage, solche Dosen über eine gewisse Zeit mit den therapeutisch notwendigen Dosen gleichzeitig zu verabreichen. Die Toleranzerzeugung mit hohen Dosen könnte zu Beginn einer Insulintherapie in einem Zeitraum von etwa 3 - 4 Monaten erfolgen. Nach Absetzen der hohen Dosen des inaktiven Insulins sollte eine einmal erreichte immunologische

Toleranz durch die Dosen der normal weitergeführten Insulintherapie erhalten bleiben, da die Erhaltung einer Toleranz wesentlich geringere Dosen verlangt. Wenn die normale Insulintherapie nicht unterbrochen wird, erfordert eine immunologische Toleranz gegenüber Insulin keine weitere Behandlung mehr.

Bei unserer Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Brandenburg aus dem Deutschen Wollforschungsinstitut in Aachen haben wir bereits eine Reihe von chemisch modifizierten Insulinen immunologisch geprüft. Danach stehen mehrere biologisch wenig aktive Insulinderivate mit nur geringfügig verminderter immunologischer Aktivität für die Erzeugung einer Insulintoleranz zur Verfügung. Ihre Eignung muß allerdings noch überprüft werden. Mit einer immunologischen Toleranz gegenüber Insulin müßte man in der Lage sein, gegenüber allen strukturell fremden tierischen oder synthetischen Insulinen eine Antikörperbildung zu verhindern.

II. Insulinresistenz

In der Literatur wurde die Tatsache, daß eine Immunisation mit krist. Insulin zu einem experimentellen Diabetes führen kann, auf die Entstehung von Antikörpern gegen Insulin zurückgeführt. Parallel hierzu kann ebenfalls angenommen werden, daß bei der während einer Insulintherapie entstehenden Insulinresistenz Insulinantikörper für den erhöhten Insulinbedarf verantwortlich gemacht werden. Wenn jedoch die Vermutung bestätigt würde, daß die Störung der G.T. nicht auf Antikörpern gegen Insulin sondern auf Antikörpern gegen Unreinheiten des kristallinen Insulins beruht, würden viele Fälle von Insulinresistenz, die keine Insulinantikörper aufweisen, besser verstanden werden. Die Reinigung des Insulins von allen kontaminierenden Substanzen mit chromatographischen Methoden würde dann ein aussichtsreicher Weg sein, um das Entstehen der antikörperbedingten Insulinresistenz zu verhindern.

III. Immundiabetes

Da die Entstehung einer pathologischen G.T. mit Insulinantikörpern in Verbindung gebracht wurde, konnte der experimentelle Immundiabetes nicht mit dem menschlichen Diabetes mellitus verglichen werden, denn bei Ausbruch des menschlichen Diabetes sind noch keine Insulinantikörper nachweisbar. Diese entstehen als Folge der Therapie mit Insulin, und zwar als Reaktion auf das zugeführte artfremde und teilweise denaturierte Insulin. Falls sich jedoch in weiteren Untersuchungen bestätigen sollte, daß nicht das Sangerinsulin die pathologische G.T. bewirkt, sondern ein von diesem strukturell völlig verschiedenes Antigen aus dem Pankreas, welches nur als Kontamination in kristallinem Insulin enthalten ist, muß erneut geprüft werden, ob der experimentelle Immundiabetes nicht doch Ähnlichkeiten mit dem menschlichen Diabetes mellitus besitzt. Man dürfte sogar annehmen, daß sich bei der Vielzahl der Störungsmöglichkeiten des Glucosemetabolismus mehrere Antigene finden lassen, die an einer pathologischen G.T. beteiligt sein können. Eines dieser möglichen Antigene könnte vielleicht auch bei einem kleinen Teil der Diabetiker einen pathogenetischen Einfluß gehabt haben. Beim Tier ist der Immundiabetes bereits eine von mehreren Autoren bestätigte Tatsache geworden, beim Menschen ist er allerdings erst noch nachzuweisen.

IV. Die immunologische Toleranz

Die Feststellung der beiden Toleranzzonen mit Insulin, der Hoch- und Niedrigdosistoleranz, sind eine Bestätigung der Befunde von zwei Toleranzzonen durch MITCHISON (1964), SHELLAM und NOSSAL (1968) und KÖLSCH und DILLER (1971) für ein weiteres Antigen, während andere Antigene nur eine Toleranzzone aufwiesen. Interessant ist, daß die Antigendosen und die Immunisationsdauer für die bisher beschriebenen Antigene mit zwei Toleranzzonen unterschiedlich sind. Man darf daher wahrscheinlich nicht wie DRESSER und MITCHISON (1968) eine für alle Antigene gleiche Dosis zur Erzeugung und Erhaltung der Niedrigdosistoleranz annehmen.

Der Vergleich von MC-Insulin mit dem höhermolekulare Unreinheiten enthaltenden krist. Insulin deutet darauf hin, daß das Molekulargewicht einen Einfluß auf die Entstehung der Toleranz hat. Zeitlich gesehen scheint die Toleranz nach Insulin mit kleinerem Molekulargewicht erst später aufzutreten. Die Dosen für die Toleranz können möglicherweise differieren, wobei die Hochdosistoleranz bei Antigenen mit kleinerem Molekulargewicht schon mit niedrigeren Dosen erreicht werden könnte.

E ZUSAMMENFASSUNG

DER EIGENEN ERGEBNISSE

Die Immunantworten und die Immuntoleranz nach Immunisation mit 1 x krist. Schweineinsulin und MC-Schweineinsulin wurden an der Maus untersucht. Da die Immunreaktionen sowohl von der Dosis als auch von der Dauer der Immunisationen abhängen, wurde der Einfluß beider Faktoren bestimmt. Die Immunisationen erfolgten ohne Freundsches Adjuvans 3 mal wöchentlich mit 6 verschiedenen Dosen von 1 ng bis zu 100 µg pro Tier, und zwar 2, 4, 8 und 12 Wochen lang an verschiedenen Tiergruppen. Während dieser Immunisation entwickelten sich nur bei einer Dosis, nämlich 1 µg, Insulinantikörper, deren Titer mit längerer Immunisationsdauer zunahm. Nach MC-Insulin wurden in der gleichen Zeit und der gleichen Dosis nur sehr niedrige Titer festgestellt. Auf den Menschen umgerechnet in Dosis/kg Körpergewicht entsprach die antikörperproduzierende Dosis der Maus etwa 25 IE/Tag und damit dem therapeutischen Dosisbereich, innerhalb dessen häufig eine Insulinantikörperbildung stattfindet.

Im Anschluß an die Immunisationsperiode ohne Adjuvans erfolgte eine Testimmunisation aller Tiere mit 100 µg Insulin in komplettem Freundschen Adjuvans, um die Erzeugung einer Toleranz festzustellen. Nur Tiere, die trotz der stark immunogenen Insulininjektion kaum Antikörper produzierten, wurden als tolerant bezeichnet. Die Tendenzen zur Toleranzentstehung in Abhängigkeit von der Dosis und der Dauer der Immunisation wurden in einem dreidimensionalen Immunmodell dargestellt, in welchem

die Dosis durch die Ordinate, die Immunisationsdauer durch die Abszisse und die Stärke der Immunreaktion durch die dritte Koordinate (Höhe des Modells) repräsentiert wurden. Solche Immunmodelle wurden sowohl für 1 x krist. Schweineinsulin, welches höhermolekulare Unreinheiten enthielt,als auch für MC-Schweineinsulin, das durch Gel- und Ionenaustauscherchromatographie hochgereinigt worden war, erhalten.

Die mit 1 x krist. Insulin erzeugten Toleranzzonen ähneln denen für Albumin (MITCHISON 1968). Im Hochdosisbereich von 10 µg und 100 µg Insulin ergab sich nach 2 Wochen eine vorübergehende Normalreaktion mit Tendenz zur Antikörperstimulation, die nach 4 - 8 Wochen in eine starke Toleranz, die Hochdosistoleranz, überging. Im mittleren Dosisbereich von 100 ng - 1 µg zeigte sich dagegen nach 8 Wochen eine kontinuierliche Normalreaktion oder Antikörperstimulation und im Niedrigdosisbereich von 1 ng - 10 ng eine zweite Zone einer starken Toleranz, die Niedrigdosistoleranz. Die beiden Toleranzzonen entsprachen denen, die MITCHISON mit Albumin gefunden hatte. Die erforderlichen Dosen mit 1 x krist. Insulin waren jedoch geringer und die Immunisationszeiten verlängert. Dieser Unterschied kann auf der unterschiedlichen Mäuselinie aber auch auf der geringeren Molekülgröße und Immunogenität des Insulins beruhen.

Mit dem hochgereinigten MC-Insulin hatte das Immunmodell einen etwas anderen Aspekt. Im Hochdosisbereich von 100 µg fand sich eine Normalreaktion mit Tendenz zur Antikörperstimulation nach einer längeren Immunisationsdauer von etwa 1 Monat, die ebenfalls nach einer längeren Zeit in eine starke Toleranz überging. Im mittleren Dosisbereich von 1 µg wurde keine Antikörperstimulation und im Niedrigdosisbereich keine Niedrigdosistoleranz festgestellt. Es ist jedoch nicht ausge-

schlossen, daß diese nach noch längerer Immunisation entstehen könnten. Das MC-Insulin war weniger immunogen, da es erst nach einer längeren Immunisationsdauer aber mit der gleichen Dosis Antikörper erzeugte. Die Hochdosistoleranz trat bei 10-fach niedrigeren Dosen als mit 1 x krist. Insulin ein.

Eine Insulitis, d.h. eine lymphozytäre Infiltration der Inseln des Pankreas,konnte sowohl mit 1 x krist. Insulin als auch mit MC-Insulin erzeugt werden. Jedoch bestand ein sehr großer Unterschied in den hierzu erforderlichen Dosen. Das nicht weiter gereinigte 1 x krist. Insulin benötigte nur Dosen im ng-Bereich (1 ng und 10 ng) und schien mit höheren Dosen bereits eine Toleranz gegenüber diesem Phänomen einzuleiten. Mit dem hochgereinigten MC-Insulin waren etwa 1 000-fach höhere Dosen (1 ug, 10 ug, 100 ug) notwendig. Dies deutet darauf hin, daß für die Insulitis eher die Verunreinigungen als das wahre Sangerinsulin verantwortlich sind.

Die Verunreinigungen können durch das Extraktionsverfahren modifizierte Insuline oder aber mit Insulin nicht kreuzreagierende Proteine der Pankreasinseln enthalten. Eine Korrelation der Insulitis mit Insulinantikörpern fand sich nicht. Die Tatsache, daß gegenüber Insulin weitgehend tolerante Tiergruppen trotzdem eine Insulitis zeigten, spricht für die Möglichkeit, daß bei der Maus möglicherweise mit Insulin nicht kreuzreagierende Antigene für die Insulitis verantwortlich waren.

Eine Periduktulitis konnte nur mit 1 x krist. Insulin erzeugt werden, nicht aber mit MC-Insulin. Hier scheint durch die Reinigung des Insulins ein Antigen weitgehend entfernt worden zu sein, das für die Periduktulitis verantwortlich ist.

Die Immunisierung mit Insulin führte zwar nicht zu einem manifesten Diabetes mellitus, wohl aber konnten pathologische Veränderungen der Glucosetoleranz beobachtet werden. Diese

ließen sich mit 1 x krist. Insulin in wesentlich geringerer Dosierung erreichen als mit hochgereinigtem Insulin und zeigten keinerlei Korrelation zu Insulinantikörpern. Daher kann auch hier erwogen werden, ob nicht ein anderes Antigen als das wahre Sangerinsulin mitbeteiligt ist, welches wie Insulin am Glucosemetabolismus teilnimmt. Daher entstand die Hypothese, daß neben Antikörpern gegen Insulin auch Antikörper gegen Enzyme oder Rezeptoren des Glucose-metabolismus auf die Glucosetoleranz störend einwirken können. Ein solcher Vorgang könnte z.B. bei jenen Insulin-resistenzen angenommen werden, die keine Insulinantikörper zeigen. Die in 1 x krist. Insulin enthaltenen Unreinheiten könnten daher für mehrere störende immunologische Reaktionen mitverantwortlich gemacht werden, so daß ihre vollständige Entfernung wünschenswert erscheint.

Literaturverzeichnis

ABEL, J.J.: Crystalline insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 12, 132 - 136 (1926)

ALBRIGHT, J.F., EVANS, T.W.: Influence of antigen dosage on kinetics of hemagglutinating antibody production. J. Immunol. 95, 368 - 377 (1965)

ANDERSSON, B.: Induction of immunity and immunologic paralysis in mice against polyvinyl pyrrolidone. J. Immunol. 102, 1309 (1969)

ANDREANI, G., CORTI, L.: Alergy to insulin: Statistical study of 1500 diabetics. J. Amer. Med. Ass. 157, 184 (1955)

ARMIN, J., GRANT, R.T., WRIGHT, P.H.: Acute insulin deficiency provoked by single injections of anti-insulin serum. J. Physiol. 153, 131-45 (1960)

ARMIN, J., GRANT, R.T., WRIGHT, P.H.: Experimental diabetes in rats produced by parenteral administration of anti-insulin serum. J. Physiol. 153, 146-65 (1960)

ARMIN, J., GRANT, R.T., LLOYD, M.K., WRIGHT, P.H.: Acute insulin deficiency provoked in the dog, pig and sheep by single injections of anti-insulin serum. J. Physiol. 157, 64 - 73 (1961)

ARQUILLA, E.R., STAVITSKY, A.B.: The production and identification of antibodies to insulin and their use in assaying insulin. J. Clin. Invest. 35, 458 (1956a)

ARQUILLA, E.R., STAVITSKY, A.B.: Evidence for the insulin-directed specificity of rabbit anti-insulin serum. J. Clin. Invest., 35, 467 - 474 (1956b)

ARQUILLA, E.R., FINN, J.: Genetic control of combining sites of insulin antibodies produced by guinea pigs. J.Exp.Med. 122, 771 - 734 (1965)

ASHERSON, G.L.,
STONE, S.H.:
Selective and specific inhibition of 24 h skin reactions in the guinea pigs. I. Immune deviation: description of the phenomenon and the effect of splenectomy.
Immunology, Lond. 9, 205 - 217 (1965)

BANTING, F.G.,
BEST, C.H.:
The internal secretion of the pancreas.
J. Laborat. Clin. Med. 7, 251 - 266
(1922)

BARRAL, P.,
ROUX, J.:
L'Insuline constitue-t-elle en elle-même un antigène spécifique.
Compt. Rend. Soc. Biol. 106, 292 - 295
(1931)

BARTELHEIMER, H.:
Insulinbedingte Hautnekrosen bei einem Diabetiker.
Schweiz. med. Wschr. 82, 573 (1952)

BERNS, A.W.,
OWENS, C.T.,
HIRATA, Y.,
BLUMENTHAL, H.T.:
The pathogenesis of diabetic glomerulosclerosis. A demonstration of insulin-binding capacity of the various histopathological components of the disease by fluorescence microscopy.
Diabetes 11, 308 - 317 (1962)

BERSON, S.A.,
YALOW, R.S.,
BAUMAN, A.,
ROTHSCHILD, M.A.,
NEWERLY, K.:
Insulin-131-I metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.
J.clin.Invest. 35, 170 - 190 (1956)

BERSON, S.A.,
YALOW, R.S.:
Insulin antagonists, insulin antibodies and insulin resistance.
Amer.J.Med. 25, 155 - 159 (1958)

BERSON, S.A.,
YALOW, R.S.:
Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-antibody.
J. Clin. Invest. 38, 1996 - 2016 (1959)

BERSON, S.A.,
YALOW, R.S.:
Species-specificity of human anti-beef, porkinsulin serum.
J. Clin. Invest. 38, 2017 - 2025 (1959)

BERSON, S.A.,
YALOW, R.S.:
Antigens in insulin. Determinants of specificity of porcine insulin in men.
Science 139, 844 (1963)

BERSON, S.A.,
YALOW, R.S.:
Deamidation of insulin during storage in frozen state.
Diabetes 15, 875 (1966)

BERTRAMS, J.,
JANSEN, F.K.,
GRÜNEKLEE, D.,
DROST, H.,
REIS, H.E.,
KREMER, G.J.,
KUWERT, E.,
GRIES, F.A.:
Genetische Assoziation des insulinbedürftigen Diabetes und der Insulinantikörperbildung mit HL-A-Histokompatibilitätsantigenen beim Menschen.
Vortrag: Dtsch. Diab. Gesellsch., Ulm 1975

BILLINGHAM, R.E.,
BRENT, L.,
MEDAWAR, P.B.:
Actively acquired tolerance of foreign cells.
Nature, Lond. 172, 603 - 605 (1953)

BIRKENSHAW, V.J.,
RANDALL, S.S.,
RISDALL, P.C.:
Formation of precipitin lines between insulin and anti-insulin serum produced in sheep and in guinea pigs.
Nature 193, 1089 (1962)

BLUMENTHAL, H.T.,
BURNS, A.W.,
OWENS, C.T.:
Insulin antibodies.
Lancet II, 783 - 785 (1963)

BLUMENTHAL, H.G.,
GOLDENBERG, S.,
BURNS, A.W.:
The pathology and pathogenesis of the disseminated angiopathy of diabetes mellitus.
Diabetes 14, 309 (1965)

BRANDENBURG, D.:
Des-Phe^{B1}-Insulin, ein kristallines Analogon des Rinderinsulins.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 741 - 750 (1969)

BRANDENBURG, D.,
GRIES, F.A.,
JANSEN, F.K.:
Insulin und modifizierte Insuline.
Deutsche Diabetes-Gesellschaft
6. Kongreß, Düsseldorf, 14. und 15. Mai 1971

BRANDENBURG, D.,
GATTNER, H.-G.,
WOLLMER, A.:
Darstellung und Eigenschaften von Acetylderivaten des Rinderinsulins, I.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 599 - 617 (1972)

BROWN, E.E.: Infectious origin of juvenile diabetes. Arch. Pediat. 73, 191 (1956)

BURROWS, B.A., PETERS, T., LOWELL, F.D.: Physical binding of insulin by gamma-globulins of insulin-resistant subjects. J. Clin. Invest 36, 393 - 397 (1957)

CATT, K.J., TREGEAR, G.W.: Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. Science 158, 1570 - 1571 (1967)

CERASI, E., HOGEMAN, O., LUFT, R., PORATH, J., ROOVETE, A.: Insulin antibodies: Description of specific serum protein localization in a patient with insulin resistant diabetes. Diabetologia 2, 45 (1966)

CHAO, P.Y., KARAM, J.H., GRODSKY, G.M.: Insulin I-131 binding in serum from normal and diabetic subjects by ultrazentrifugation and gel-filtration. Diabetes 14, 27 (1965)

CHETTY, M.P., WATSON, K.C.: Antibody-like activity in diabetic and normal serum, measured by complement consumption. Lancet I, 67 - 69 (1965)

CHILLER, J.M., HABICHT, G.S., WEIGLE, W.O.: Kinetic differences in unresponsiveness of thymus and bone marrow cells. Science, 171, 183 (1971)

CINADER, B., DUBERT, J.M.: Acquired immune tolerance to human albumin and the response to subsequent injections of diazo human albumin. Brit. J. exp. Path. 36, 515 (1955)

COLE, L.: Diabetes mellitus in children. Lancet 1, 947 (1934)

COLEMAN, S.L., BECKER, B., CANAAN, S., ROSENBAUM, L.:
Fluorescent insulin staining of the diabetic eye.
Diabetes 11, 375 - 377 (1962)

COOMBS, R.R.A., GELL, P.G.H.:
Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Clinical aspects of immunology.
Eds. GELL, P.G.H. and R.R.A. COOMBS
S. 575, Blackwell Scient. Publ. Oxford & Edinburgh (1968)

CRAIGHEAD, J.E., McLANE, M.F.:
Diabetes mellitus: Induction in mice by encephalomyocarditis virus.
Science 162, 913 - 914 (1968)

CRAIGHEAD, J.E., STEINKE, J.:
Diabetes mellitus-like syndrome in mice infected with EMC virus.
Amer. J. Path. 63, 119 - 130 (1971)

CREUTZFELDT, W., SCHLAGINTWEIT, S.:
Kasuistischer Beitrag zur Wirkung der Sulfonylharnstoffe bei einigen Sonderformen der Zuckerkrankheit.
Dtsch. med. Wschr. 82, 1539 (1957)

CREUTZFELDT, W., KERN, E., KÜMMERLE, F., SCHUMACHER, J.:
Die radikale Entfernung der Bauchspeicheldrüse beim Menschen. Indikationen, Ergebnisse, Folgeerscheinungen.
Erg. Inn. Med. Kh. 16, 79 (1961)

CUNNINGHAM, N.F., PATTERSON, D.S., WRIGHT, P.H.:
Acute insulin deficiency provoked in sheep and cows by single injections of anti-insulin serum.
J. Physiol. 169, 137 (1963)

DAWEKE, H., BACH, I.:
Zur Therapie und Genese der chronischen Insulinresistenz.
1. Symp. Dtsch. Diab. Komittee. In: Oberdisse, K. und K. Jahnke: Fortschritte der Diabetes-Forschung. S. 43, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1963a)

DAWEKE, H.,
BACH, I.:
Neue Erkenntnisse in der Behandlung chronischer Insulinresistenz und experimentelle Untersuchungen zu ihrer Genese.
Klin. Wschr. 41, 257 (1963 b)

DAWEKE, H.:
Klinik der Insulinresistenz.
Dtsch. med. Wschr. 91, 974 - 978 (1966)

DAWEKE, H.:
Die Therapie der immunologisch bedingten Insulinresistenz: Die Behandlung mit Insulinen (i.v.-Insulintherapie, Monospezies- und modifizierte Insuline).
Rundtischgespräch: Therapieprobleme bei Insulinresistenz.
74. Kongr. Dtsch. Ges. Inn. Med., Wiesbaden 1968

DECKERT, T.,
ANDERSEN, O.O.,
GRUNDAHL, E.,
KERP, L.:
Isoimmunization of man by recrystallized human insulin.
Diabetologia 8, 358 - 361 (1972)

DEVEY, M.,
CARTER, D.,
SANDERSON, C.J.,
COOMBS, R.R.A.:
IgD antibody to insulin.
The Lancet II, 1280 (1970)

DEVLIN, J.G.,
BRIEN, T.G.:
Relationship between differential antibody binding capacity and clinical requirements of beef and pork insulin.
Metabolism 14, 1034 - 1036 (1965)

DEVLIN, J.G.:
Evidence for the existence of an IgM immunoglobulin to insulin.
Irish J. med. Sci. 6th series. No. 491, 507 (1966)

DEVLIN, J.G.:
Hormone resistance and hypersensitivity.
Clinical aspects of immunity.
Eds.: P.G.H. GELL and R.R.A. COOMBS, Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific Publications p. 672 (1968)

DE WECK, A.L.,
FREY, J.R.:
Immunotolerance to simple chemicals.
In: Monographs in allergy.
Karger, Basel/New York (1966)

DITSCHUNEIT, H.,
KAPP, H.,
FAULHABER, J.-D.,
PFEIFFER, E.F.,
SCHÖFFLING, K.:
Über Nachweis und klinische Bedeutung von Insulinantikörpern bei Insulinresistenz.
9. Symp. Dtsch. Ges. Endokrin. S. 186
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)

DITSCHUNEIT, H.,
FEDERLIN, K.:
Beitrag zur Pathogenese der Insulinresistenz.
Dtsch. med. Wschr. 91, 853 - 858
(1966)

DITZOV, S.,
PENCEV, I.,
ANDREEV, D.,
STRAKOV, L.,
TARKOLEV, N.:
Insulin Immunology.
Insulin-binding antibodies in insulin-treated and untreated diabetic patients.
European Association for the Study of Diabetes. 7th Annual Meeting,
Southampton 1971

DIXIT, P.K.,
MORGAN, C.R.,
LOWE, I.P.,
LAZAROW, A.:
Anti-insulin serum hyperglycemia.
Effect on in vitro glucose utilization and insulin degeneration by rat epididymal fat pad.
Metabolism 12, 642-52 (1963)

DIXON, F.J.,
MAURER, P.H.:
Immunological unresponsiveness induced by protein antigens.
J. exp. Med. 101, 245 - 257 (1955)

DOLOVICH, J.,
SCHNATZ, J.D.,
REISMAN, R.E.,
YAGI, Y.,
ARBESMAN, C.:
Insulin allergy and insulin resistance.
J. Allergy 46, 127 (1970)

DRESSER, D.W.: Specific inhibition of antibody production. II. Paralysis induced in adult mice by small quantities of protein antigen. Immunology, 5, 378 (1962)

DRESSER, D.W., MITCHISON, N.A.: The mechanism of immunological paralysis. Adv. Immun. 8, 129 (1968)

DUNCAN, G.G., LEE, C.T., YOUNG, J.K.: Clinical experiences with the sulfonylurea compounds. Ann. N.Y. Acad. Sci. 71, 233 (1957/58)

ENGEL, R.: Insulinrefraktärer Diabetes bei schwerem Leberschaden. Klin. Wschr. 11, 1682 - 1684 (1934)

EZRIN, C., MOLONEY, P.J.: Resistance to insulin due to neutralizing antibodies. J. clin. Endocrin. 19, 1055 (1959)

FALTA, W.: Über einen insulinrefraktären Fall von Diabetes mellitus. Klin. Wschr. 3, 1315 (1924)

FANKHAUSER, S.: Zur Klinik und Therapie der Insulinresistenz. Praxis (Bern) 53, 185 (1964)

FANKHAUSER, S., MICHL, J.: New possibilities to avoid the formation of insulin-antibodies in diabetic patients. European Association for the Study of Diabetes. 7th Annual Meeting, Southampton (1971)

FARRELL, H.W., HAND, A.M., NEWCOMB, A.L.: Infantile diabetes. Diabetes 2, 85 (1953)

FEDERLIN, K., REINOLD, A.E., PFEIFFER, E.F.: Antigen-binding leucocytes in patients and in insulin-sensitized animals with delayed insulin allergy. Immunopathology Vth Int. Symposium. Ed. by P.A.MIESCHER and P.GRABAR, Basel/Stuttgart: Schwabe & Co. Publ. 1968, p. 107

FEDERLIN, K., KRIEGBAUM, D., FLAD, H.D.: Lymphozytentransformation in vitro bei verschiedenen Formen der Insulinallergie. Therapiewoche 18, 2042 - 2044 (1968)

FEDERLIN, K., BILDERMANN, M., PFEIFFER, E.F.: Antikörperbildende Zellen im Blut nach Sensibilisierung mit Insulin. Z. Immun. Forsch. Allerg. Klin. Immun. 138, 141 - 153 (1969)

FEDERLIN, K.: Autoimmunphänomene bei Erkrankungen endokriner Drüsen. Klin. Wschr. 47, 337 (1969)

FEDERLIN, K., DITSCHUNEIT, H., PFEIFFER, E.F.: Insulinallergie und Insulinresistenz. Handbuch des Diabetes mellitus. Herausgegeben von E.F.PFEIFFER, Ulm Band II/Vol.II J. Lehmanns Verlag, München (1971 b)

FEDERLIN, K.: Immunopathology of insulin. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, Monographs on Endocrinology 6 (1971 a)

*

FELDMANN, M., DIENER, E.: Antibody-mediated suppression of the immune response in vitro. III. Low zone tolerance in vitro. Immunology 21, 387 (1971)

FELTON, L.D., KAUFFMANN, G., PRESCOTT, B., OTTINGER, B.: Studies on the mechanism of the immunological paralysis induced in mice by pneumococcal polysaccharides. J. Immunol. 74, 17 - 26 (1955)

FIELD, J.B.: Studies on steroid treatment of chronic insulin resistance. Diabetes 11, 165 (1962)

*

FEDERLIN, K., JONATHA, E.M., HUPFELD, P., SCHROEDER, K.E.: Erfahrungen mit chromatographisch gereinigtem Insulin bei Patienten mit erhöhtem Insulinbedarf, Insulinallergie oder Lipodystrophie. Therapiewoche 17, 1940 - 1953 (1974)

FREI, P.C.,
BENACERRAF, B.,
THORBECKE, G.J.:
Phagocytosis of the antigen, a crucial step in the induction of the "primary response".
Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 20 (1965)

FREI, P.C.:
Further characterization of immune tolerance obtained in adult rabbits with non-immunogenic BSA. Attempts at passive transfer.
Int. Arch. Allergy 36, 103 - 111 (1969)

FREYTAG, G.:
Histologische und autoradiographische Untersuchungen am Inselsystem der Maus beim Insulinantikörper-Diabetes.
Beitr. path. Anat. 137, 121-148 (1968)

FREYTAG, G.,
SCHAARSCHMIDT, W.,
REICHEL, W.:
Tierexperimentelle immunologische Pankreas- und Inselveränderungen nach Insulinextrakten verschiedener Reinheitsgrade.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 52, 303 - 310 (1968)

FREYTAG, G.,
KLÖPPEL, G.:
Experimentelle Insulitis und Pankreatitis nach Immunseren gegen Pankreasextrakte verschiedener Reinheitsgrade.
Beitr. path. Anat. 138, 138 - 160 (1969)

FREYTAG, G.,
MENKE, B.:
Latenter Diabetes mellitus bei Meerschweinchen während der aktiven Immunisierung gegen Fremdinsulin.
Symp. Dtsch. Ges. Endokrin. 16, 349 - 351 (1970)

FREYTAG, G.,
MITSCHKE, H.,
KLÖPPEL, G.:
Immunpathologische Untersuchungen zur experimentellen Insulitis.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 54, 290-297 (1970)

FREYTAG, G.: Immunpathologie des Diabetes mellitus. Veröffentlichungen aus der Morphologischen Pathologie. Vol. 88 edit. by W. Giese, W. Büngler, G. Seifert und G. Peters. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1972

FREYTAG, G., KLÖPPEL, G., JANSEN, F.K.: Immunologische Nebenwirkungen von Insulin-Präparaten im Tierversuch. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie. 56, 397 - 400 (1972)

FREYTAG, G., ALTENAEHR, E., JANSEN, F.K., KLÖPPEL, G.: Manifester Diabetes und Insulitis beim Kaninchen nach Immunisierung mit Rinder-Insulin. Deutsche Diabetes-Gesellschaft 8. Kongreß München, 21. bis 23. Juni 1973

FREYTAG, G., JANSEN, F.K., KLÖPPEL, G.: Immune reactions to fractions of crystalline insulin. I. Significance of lymphocytic infiltrates in the endocrine and exocrine pancreas of mice. Diabetologia 9, 185 - 190 (1973)

FRIEDLÄNDER, E.O.: Use of tolbutamide in insulin-resistant diabetes. New Engl. J. Med. 257, 11 (1957)

GEPTS, W.: Die Histopathologie der Langerhansschen Inseln bei juvenilem Diabetes, besonders in akuten Fällen. In: Fortschritte der Diabetesforschung, Hrsg. OBERDISSE, K. und JAHNKE, K., G. Thieme, Stuttgart, S. 133 (1963)

GEPTS, W.: Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. Diabetes 14, 619 - 633 (1965)

GREGOR, W.H.,
MARTIN, J.M.,
WILLIAMSON, J.R.,
LACY, P.E.,
KIPNIS, D.M.:
A study of the diabetic syndrome produced in rats by anti-insulin serum.
Diabetes 12, 73 - 81 (1963)

GRIEBLE, H.C.:
Renal lesions induced by heterologous insulin. An example of foreign protein nephritis.
J. Lab. clin. Med. 56, 8129 (1960)

GRODSKY, G.M.,
PENG, C.T.:
Extractable insulin measured by immuno-chemical assay: Effect of tolbutamide.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)
101, 100 (1959)

GRODSKY, G.M.,
FORSHAM, P.H.:
An immunochemical assay of total extractable insulin in man.
J. Clin. Invest. 39, 1070 (1960)

GRODSKY, G.M.:
Production of autoantibodies to insulin in man and rabbits.
Diabetes 14, 396 - 403 (1965)

GRODSKY, G.M.,
FELDMAN, R.,
TORESON, W.E.,
LEE, J.C.:
Diabetes mellitus in rabbits immunized with insulin.
Diabetes 15, 579 - 585 (1966)

GRÜNEKLEE, D.,
HESSING, J.,
DAWEKE, H.,
HERBERG, L.,
GRIES, F.A.:
Insulin resistance without circulating antibodies, evidence for an antagonist?
Diabetologia, 7, 482 (1971a)

GRÜNEKLEE, D.,
HESSING, J.,
DAWEKE, H.:
Comparative studies of the blood sugar lowering effect of insulin from different species in insulin resistant patients.
Diabetologia, 7, 482 (1971b)

GRÜNEKLEE, D., HERBERG, L., DAWEKE, H.: Anhalt für einen blutzuckererhöhenden Faktor im Blut von Patienten mit Insulinresistenz ohne nachweisbare humorale Antikörper. 7. Kongreß der Deutschen Diabetes-Gesellschaft Bad Nauheim. Reproduction Novo 160 (1972)

GUNDERSEN, E.: Is diabetes of infectious origin? J. Infect. Dis. 41, 197 (1927)

HALES, C.N., RANDLE, P.J.: Immunoassay of insulin by isotopic dilution. Biochem. J. 84, 79 (1962)

HANAN, R., OYAMA, J.: Inhibition of antibody formation in mature rabbits by contact with antigen at an early age. J. Immunol. 73, 49 (1954)

HANAUER, L., BATSON, J.M.: Anaphylactic shock following insulin injection. Diabetes 10, 105 (1961)

HANSEN, K.: Arzneimittelallergie. In: K. HANSEN: Allergie. S. 395. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1957)

HARFENIST, E.J., CRAIG, L.C.: Counter current distribution studies with insulin. J. Amer. Chem. Soc. 74, 3083 - 3087 (1952)

HASEK, M.: Manifestations of vegetative relationship in adaptation of higher animals to heterogenous antigens. Csl. Biol. 3, 327 (1954)

HEDING, L.G.: A simplified insulin radioimmunoassay method, labelled proteins in tracer studies. Ed. L. Donato et al. Euratom, Brussels p. 345 - 351 (1966)

HERBERT, V.,
LAU, K.S.,
GOTTLIEB, C.W.,
BLEICHER, S.J.:
Coated charcoal immunoassay of insulin.
J. clin. Endocr. 25, 1375 - 1384
(1965)

HIRATA, Y.,
BLUMENTHAL, H.T.:
Precipitation of insulin with sera of insulin-treated guinea pigs and rabbits.
J. Lab. Clin. Med. 60, 194 (1962)

HOFFMAN, W.S.:
A rapid photoelectric method for the determination of glucose in blood and urine.
J. biol. Chem. 120, 51 - 55 (1967)

HOWARD, J.G.,
ZOLA, H.,
CHRISTIE, H.,
COURTENAY, B.M.:
Studies on immunological paralysis:
V. The influence of molecular weight on the immunogenicity, tolerogenicity and antibody-neutralizing activity of type III pneumococcal polysaccharide.
Immunology, 21, 535 (1971)

HRABA, T.:
Mechanism and role of immunological tolerance. In: Monographs in allergy.
S. Karger, Basel, New York (1968)

HUMPHREY, J.H.,
WHITE, R.G.:
Immunology for students of medicine.
2nd. Edition, Oxford: Blackwell
p. 300 (1964)

IDSOE, O.,
GUTHE, T.,
WILLCOX, R.R.,
DE WECK, A.L.:
Nature et importance des reactions secondaires a la penicilline, compte tenu notamment des cas mortels par choc anaphylactique.
Biol. Med. (Paris) 57, 402-448
(1968)

JACKSCH-WARTENHORST, R. v.:
Zeitgemäße Diabetestherapie.
Münch. Med. Wschr. I, 973 (1925)

JANSEN, F.K.,
BRANDENBURG, D.:
Das Absorptionsverhalten von N-terminalen Derivaten des Insulins im radioaktiven Insulintest zur Beurteilung antigener Gruppen des Insulins und seiner dreidimensionalen Molekülstruktur in Lösungen.
2. Tagung der Gesellschaft für Immunologie
19.-21. Oktober 1970, Wien, Österreich

JANSEN, F.K.: Tolerance to high and low doses of natural crystalline insulin. Diabetologia 7, 290 - 292 (1971)

JANSEN, F.K.: Influence of higher molecular components of insulin on the time and dose dependence of antibody stimulation and tolerance induction. Proceedings of the Second International Symposium Liège, September 28-October 1, 1971 Ed.: M. Margoulies, F.C. Greenwood Excerpta Medica (1972)

JANSEN, F.K., BRANDENBURG, D.: Beurteilung der Antigenität von modifizierten Insulinen mit der radioimmunologischen Insulinbestimmung. Deutsche Diabetes-Gesellschaft 7. Kongreß Bad Nauheim, 4. bis 6. Mai 1972

JANSEN, F.K., FREYTAG, G.: Immune reactions to fractions of crystalline insulin. II. May periinsulitis be produced by an antigen different from true Sanger insulin? Diabetologia 9, 191 - 196 (1973)

JANSEN, F.K., HERBERG, L.: Immune reactions to fractions of crystallized insulin. III. Relation between glucose tolerance, purification of insulin and insulin antibodies. Horm. Metab. Res. 5, 395 - 400 (1973)

JONES, V.E., CUNLIFFE, A.C.: A precipitating antibody to insulin. Nature 192, 136 (1961)

JORPES, J.E.: Recrystallized insulin for diabetic patients with insulin allergy. Arch. klin. Med. 83, 363 (1949)

JOSLIN, E., GRAY, H., ROOT, R.: Insulin in hospital and home. J. metabolic. Res. 2, 651 (1922)

KABAT, E.A., BEZER, A.E.: The effect of variation in molecular weight on the antigenicity of dextran in man. Arch. Biochem. Biophys. 78, 306 (1958)

KALLEE, E.: Über ^{131}J-signiertes Insulin. Z. Naturforsch. 7B, 661 (1952)

KASEMIR, H., KERP, L., KIELING, F.: Zur Pathogenese der antikörperbedingten Insulinresistenz. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 74, 555 - 558 (1968)

KAYE, M., McGARDY, E., ROSENFELD, J.: Acquired insulin resistance: A case report. Diabetes 4, 133 (1955)

KERP, L., STEINHILBER, S.: Quantitativer Nachweis insulinbindender Proteine durch Differentialadsorption. In: Protides of the biological fluids (ed. H. PEETERS), vol. 11, p. 455 Amsterdam-London-New York: Elsevier Publ. Co. (1963)

KERP, L., STEINHILBER, S., KIELING, F., CREUTZFELDT, W.: Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Insulinallergie und Insulinresistenz. Dtsch. med. Wschr. 90, 806 (1965)

KERP, L., STEINHILBER, S., KASEMIR, H.: Ein Verfahren zum Nachweis insulinbindender Antikörper durch Differentialadsorption. Klin. Wschr. 44, 560 (1966)

KERP, L., KIELING, F., STEINHILBER, S.: Zur Lokalisation von Antikörper-Bindungsstellen an heterologen Insulinmolekülen. Die Naturwissenschaften 54, 167 - 168 (1967 a)

KERP, L., KIELING, F., KASEMIR, H.: Zur Lokalisation von Antikörper-Bindungsstellen an homologen Insulinmolekülen. Die Naturwissenschaften 54, 368 - 369 (1967 b)

KERP, L.,
KASEMIR, H.,
KIELING, F.,
KEIDERLING jr., W.:
Spezifität der gegen isolierte A- und B-Ketten und gegen intaktes Insulin gebildeten Antikörper.
Die Naturwissenschaften 54, 589 (1967 c)

KERP, L.,
SIHLER, K.,
RAJU, S.,
BERNING, E.,
STEINHILBER, S.:
Influence of prednisolon and ACTH on the formation of insulin-binding antibodies.
Int. Arch. Allergy 31, 195 (1967)

KERP, L.,
KASEMIR, H.,
KIELING, F.:
Insulinbindende Antikörper und Insulinbedarf bei Diabetikern.
Klin. Wschr. 46, 376 - 385 (1968 a)

KERP, L.:
Insulinallergie und Insulinresistenz.
Verh. Dtsch. Ges. Allergie und Immun. Forsch., F. K. Schattauer, Stuttgart, 1968

KERP, L.,
KASEMIR, H.,
KIELING, F.,
STEINHILBER, S.:
Localisation of antibody binding sites on insulin molecules.
Int. Arch. Allergy 36/1,2, 143 - 151 (1969)

KERP, L.,
LANGER, I.,
KASEMIR, H.,
STEINHILBER, S.:
Induktion einer "low dose tolerance" gegen Rinderinsulin bei Meerschweinchen.
Klin. Wschr. 47, 492 - 493 (1969)

KERP, L.,
STEINHILBER, S.,
KASEMIR, H.:
Besitzt die Proinsulinverunreinigung kommerzieller Insulinpräparate Bedeutung für die Stimulierung von Insulinantikörpern?
Klin. Wschr. 48, 884 - 885 (1970)

KERP, L.:
Quantitative data concerning the localisation of antibody binding sites on insulin and proinsulin molecules.
Int. Arch. Allerg. Appl. Immunol. 41, 216 - 218 (1971)

KERP, L.:
Vortrag: 8. Kongreß Intern. Diabetesföderation, Brüssel 1973

KERP, L.,
STEINHILBER, S.,
KASEMIR, H.,
et al.:
Changes in immunospecificity and biologic activity of bovine insulin due to subsequent removal of the amino acids B_1, B_2 and B_3.
Diabetes 23, 651 - 656 (1974)

KLÖPPEL, G.,
ALTENÄHR, E.,
FREYTAG, G.:
Studies on ultrastructure and immunology of the insulitis in rabbits immunized with insulin.
Virchows Arch. Abt. A. Path. Anat. 356, 1 - 15 (1972)

KLÖPPEL, G.,
ALTENÄHR, E.,
JANSEN, F.K.,
FREYTAG, G.:
Relations between insulitis, intracutaneous skin reaction, antibody titer and decreased glucose tolerance in rabbits immunized with bovine insulin.
Int. Kongreß Brüssel (1973)

KÖLSCH, E.,
DILLER, E.:
Genetics of the immune response.
II. Paralysis by phage fd in high and low responding inbred strains of mice.
Eur. J. Immunol. 1, 210 - 213 (1971)

KREMER, H.U.:
Juvenile diabetes as a sequel to mumps.
Amer. J. Med. 3, 257 (1947)

KREUTZER, H.H.,
MOORS, J.J.,
VERHILLE, R.:
Specificke resistentie tegen runder insuline.
Med. tschr. geneesk. 100, 3598 (1956)

KRÜGER, H.U.:
Blutzuckersenkende Wirkung von Cyclophosphamid bei Diabetikern.
Med. Klinik 61, 1462 (1966)

KÜHNAU, J.,
STRITZKY, A. v.:
Mit Schweineinsulin erfolgreich behandelte Insulinresistenz bei Diabetes mellitus.
Schweiz. med. Wschr. 93, 914 (1963)

KÜHNAU, J. jr.:
Insulinantikörper bei Diabetikern in einer prospektiven Studie mit Rinder- und Schweine-Insulinen.
7. Kongreß der Deutschen Diabetes-Gesellschaft Bad Nauheim, 4. bis 6. Mai 1972

KULPE, W.:
Hautnekrosen bei der Insulinbehandlung durch Surfen-Überempfindlichkeit.
Münch. med. Wschr. 100, 998 (1958)

LACY, P.E.,
WRIGHT, P.H.:
Allergic interstitial pancreatitis in rats injected with guinea pig anti-insulin serum.
Diabetes 14, 634 - 642 (1965)

LAPRESLE, C.,
GRABAR, P.:
Mise en évidence d'une impureté antigenique dans les preparations d'insuline et d'anticorps correspondants dans le sérum de diabetique traités par l'insuline.
Rev. Franc. Étud. Clin. Biol. 2, 1025 (1957)

LECOMPTE, P.M.:
"Insulitis" in early juvenile diabetes.
Arch. Path. 66, 450 - 457 (1958)

LECOMPTE, P.M.,
LEGG, M.A.:
Insulitis (lymphocytic infiltration of pancreatic islets) in late-onset diabetes.
Diabetes 21, 762 - 769 (1972)

LEE, J.C.,
GRODSKY, G.M.,
CAPLAN, J.,
CRAW, J.:
Experimental immune diabetes in the rabbit. Light, fluorescence, and electron microscopic studies.
Am. J. Pathol. 57, 597 - 616 (1969)

LEVETT, R.E.,
KORP, W.:
Immunological aspects in diabetes. Monocomponent Insulin. A clinical trial after one year.
European Association for the Study of Diabetes, 8th Annual Meeting, Madrid 1972
Diabetologia 9, 78 (1973)

LIENERT, G.A.:
Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik.
Verlag Anton Hain, Meisenheim am Glan (1962)

LITTLE, J.A.,
ARNOTT, J.H.:
Sulfated insulin in mild, moderate, severe and insulin-resistant diabetes mellitus.
Diabetes 15, 457 (1966)

LOGOTHETOPOULOS, J., BELL, E.G.: Histological and autoradiographic studies of the islets of mice injected with insulin antibody. Diabetes 15, 205 - 211 (1966)

LOWELL, F.C.: Immunologic studies in insulin resistance. II. The presence of a neutralizing factor in the blood exhibiting some characteristics of an antibody. J. Clin. Invest. 23, 233 (1944)

LOWELL, F.C., FRANKLIN, W.: Induced insulin resistance in the rabbit. J. Clin. Invest. 28, 199 - 206 (1949)

MAHLER, P., PASTERNY, K.: Klinische Beobachtungen über Insulinwirkung beim Diabetes mellitus. Med. Klin.(1924) 1, 337 - 340

MAKULU, D.R., VICHICK, D., WRIGHT, P.H., SUSSMAN, K.E., PAO-LO YU.: Insulin immunoassay by back-titration using alcohol precipitation of insulin-antibody complexes. Diabetes, 18, 660 - 669 (1969)

MANCINI, A.M., CONSTANZI, G., ZAHMPA, G.A.: Human insulin antibodies detected by immunofluorescence technique. Lancet I, 726 (1964)

MANCINI, A.M., ZAMPA, G.A., GEMINIANI, G.D., VECCHI, A.: Experimental nodular "diabetic-like" glomerulosclerosis in guinea pigs following long-acting, heterologous insulin immunization. Diabetologia 5, 155 (1969)

MARBLE, A.: Allergy and diabetes. In: E.P. JOSLIN, H.F. ROOT, P. WHITE and A. MARBLE: The treatment of diabetes mellitus. S. 395 Lea & Febiger, Philadelphia (1959)

MARKUSSEN, J.: Mouse insulins - separation and structures. Int. J. Protein Research 111, 149 - 155 (1971)

MARTIN, W.P., MARTIN, H.E., LYSTER, R.W., STROUSE, S.: Insulin resistance. Critical survey of the literature with the report of a case. J. clin. Endocr. 1, 387 (1941)

MATANGKASOMBUT, P., SEASTONE, C.V.: Sequence of events in mice early in immunologic paralysis by pneumococcal polysaccharide. J. Immunol., 100, 845 (1968)

MEADE, R.C., KLITGAARD, H.M.: A simplified method for immuno-assay of human serum insulin. J. nucl. Med. 3, 407 - 416 (1962)

MEADE, R.C.: Placental transfer of insulin-binding antibodies in the guinea pig. Am. J. Physiol. 205, 845 - 847 (1963)

MEDLIN, J., RIHA, I., STERZL, J.: The antibody response preceding immunological paralysis. Folia Biol. 15, 309 (1969)

MELANI, F., DITSCHUNEIT, H., BARTELT, K.M., FRIEDRICH, H., PFEIFFER, E.F.: Über die radioimmunologische Bestimmung von Insulin im Blut. Klin. Wschr. 43, 1000 (1965)

MELIN, K., URSING, B.: Diabetes mellitus. Nord. Med. 60, 1715 - 1717 (1958)

MERIMEE, T.J.: Insulin resistance. Study of effect of 6-mercaptopurine. Lancet I, 69 (1965)

MEYENBURG von, H.: Über "Insulitis" bei Diabetes. Schweiz. med. Wschr. 70, 554 - 557 (1940)

MILLER, R.: Tödliche anaphylaktische Reaktion nach Insulininjektion. Med. Welt, S. 2735 (1962)

MIRSKY, I.A., JINKS, R., PERISUTTI, G.: Production of diabetes mellitus in the duck by insulin antibodies. Am. J. Physiol. 206, 133 - 135 (1964)

MIRSKY, I.A., KAWAMURA, K.: Heterogenity of crystalline insulin. Endocrinology 78, 1115 - 1119 (1966)

MITCHISON, N.A.: Induction of immunological paralysis in two zones of dosage. Proc. roy. Soc. B 161, 275 - 292 (1964)

MITCHISON, N.A.: Recovery from immunological paralysis in relation to age and residual antigen. Immunology 9, 129 (1965)

MITCHISON, N.A.: Immunological tolerance. Tissue and Organ Transplantation. 7. clin. Path. Suppl. 20, 451 (1967)

MITCHISON, N.A.: The dosage requirements for immunological paralysis by soluble proteins. Immunology, 15, 509 (1968)

MÖLLER, G.: Antibody-induced depression of the immune response: a study of the mechanism in various immunological systems. Transplantation 2, 405 - 415 (1964)

MOHOS, S.C., HENNINGAR, G.R., FOGELMAN, J.A.: Insulin induced glomerulosclerosis in the rabbit. J. exp. Med. 118, 667 (1963)

MOLONEY, P.J., COVAL, M.: Antigenicity of insulin. Diabetes induced by specific antibodies. Biochem. J. 59, 179 - 185 (1955)

MOLONEY, P.J., APRILE, M.A.: On the antigenicity of insulin: Flocculation of insulin-antiinsulin. Canad. J. Biochem. Physiol. 37, 793 (1959)

MOLONEY, P.J., APRILE, M.A., WILSON, S.: Sulfated insulin for treatment of insulinresistant diabetics. J. New. Drugs 4, 258 (1964)

MOLONEY, P.J., TIRPAK, A.E.: Immunotolerance to ox insulin induced in the adult guinea pig. Canad. med. Ass. J. 100, 573 - 575 (1969)

MOLONEY, P.J., EVANS, M.A.: Immunotolerance to insulin and Freund's adjuvant. Canad. J. Biochem. 49/8, 865 - 866 (1971)

MOLONEY, P.J., JACKSON, S.G.: Specific immunosuppression of antibody response to ox insulin. Effect of adjuvant and dosage of maleyl insulin. Canad. J. Biochem. 51, 421 - 427 (1973)

MORGAN, C.R., LAZAROW, A.: Immunoassay of insulin using a two-antibody system. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 110, 29 (1962)

MORSE, J.H., HEREMANS, J.F.: Correlation of insulin requirements with concentration of insulin-binding antibody and its papain-produced fragments. J. Lab. clin. Med. 59, 892 (1962)

MÜNTEFERING, H., SCHMIDT, W.A.K., KÖRBER, W.: Experimenteller Beitrag zur Virusgenese des Diabetes mellitus bei der weißen Maus. Verh. dtsch. Ges. Path. 54, 669 - 670 (1970)

MÜNTEFERING, H., SCHMIDT, W.A.K., KÖRBER, W.: Zur Virusgenese des Diabetes mellitus bei der weißen Maus. Dtsch. med. Wschr. 96, 693 - 699 (1971)

MÜNTEFERING, H.: Zur Pathologie des Diabetes mellitus der weißen Maus bei der EMC-Virusinfektion. Histologische, elektronenmikroskopische und quantitativ morphologische Befunde an den Langerhansschen Inseln. Virchows Arch. Abt. A Path. Anat. 356, 207 - 234 (1972)

NOSSAL, G.J.V., ADA, G.L., AUSTIN, C.M.: Antigens in immunity. X. Induction of immunologic tolerance to Salmonella adelaide flagellin. Immunology, 95, 665 (1965)

OAKLEY, W., JONES, V.E., CUNLIFFE, A.C.: Insulin resistance. Birt. Med. J. 2, 134 (1967)

OBERDISSE, K.: Insulinresistenz und Diabetes mellitus. Dtsch. Arch. klin. Med. 193, 247 (1948)

OPIE, E.L.: The relation of diabetes mellitus to the lesions of the pancreas. Hyaline degeneration of the islets of Langerhans. J. Exp. Med. 5, 527 (1901)

OWEN, R.D.: Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. Science 102, 400 (1945)

PARISH, C.R., LANG, P.G., ADA, G.L.: Tolerance in adult rats to a purified protein, flagellin from Salmonella adelaide. Nature (Lond.), 215, 1202 (1967)

PARISH, C.R., WISTAR, R., ADA, G.L.: Cleavage of bacterial flagellin with cyanogen bromide. Antigenic properties of the protein fragments. Biochem. J. 113, 501 - 506 (1969a)

PARISH, C.R., ADA, G.L.: The tolerance inducing properties in rats of bacterial flagellin cleaved at the methionine residues. Immunology, 17, 153 (1969b)

PATRICK, A.: Acute diabetes following mumps. Brit. Med. J. 2, 803 (1924)

PATTERSON, R., COLWELL, J.A., GREGOR, W.H., CARY, E.: Avian anti-insulin serum: a comparison of its immunologic and biologic activity with that of guinea pig and rabbit antisera. J. Lab. Clin. Med. 64, 399 (1964)

PAV, J., JEZKOVA, Z., SKRHA, F.: Insulin antibodies. Lancet 2, 221-22 (1963)

PENCHEV, I., ANDREEV, D., DITZOV, S.: Insulin-precipitating antibodies in insulin-treated and untreated diabetic patients. Diabetologia 4, 164 (1968)

PFEIFFER, E.F.: Die Insulinresistenz. (Aktuelle Diagnostik.) Dtsch. med. Wschr. 91, 314 (1966)

POTTER, E.L.,
SECKEL, H.P.,
STRYKER, W.A.:
Hypertrophy and hyperplasia of islets of Langerhans in fetus and newborn infants.
Arch. Path. 31, 467 - 482 (1941).

PROUT, T.E.,
KATIMS, R.B.:
Relationship between serum binding globulin and insulin requirement.
Bull. Johns Hopk. Hosp. 106, 119 (1960).

RAJEWSKY, K.,
SCHIRRMACHER, V.,
NASE, S.,
JERNE, N.K.:
The requirement of more than one antigenic determinant for immunogenicity.
J. Exp. Med. 126, 1131 (1969).

RENOLD, A.E.,
SOELDNER, J.S.,
STEINKE, J.:
Immunologic studies with homologous and heterologous pancreatic insulin in the cow. In: Aetiology of diabetes mellitus and its complications.
Ciba Foundation Colloquia 15,
Cameron, M.P., and O'Connor, M., Eds.,
Churchill, London, 1964, p. 122 - 130.

ROOT, H.F.:
Insulin resistance and bronce diabetes.
N. Engl. J. Med. 201, 201 (1929).

ROSE, C.,
BARRON, J.:
Anaphylactic shock as a complication of insulin coma therapy.
Brit. med. J. 1955, I, 583.

ROSSELIN, G.,
TSCHOBROUTSKY, G.,
ASSAN, R.,
LELLOUCH, L.,
DOLAIS, J.,
DEROT, M.:
Étude quantitative d'anticorps humains anti-insulines animales par la méthode Radio-Immunologique de BERSON et YALOW.
Diabetologia 1, 33 (1965).

ROSSELIN, G.,
ASSAN, R.,
YALOW, R.S.,
BERSON, S.A.:
Separation of antibody bound and unbound peptide hormone labelled with iodine 131 by talcum powder and precipitated silica.
Nature 212, 355 - 357 (1966).

SANGER, F.:
Chemistry of insulin.
Brit. Med. Bull. 16, 183 (1960).

SAMOLS, E.,
JONES, V.:

Insulin resistance and the relationship of human antibodies to insulin when measured by three different methods. First Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Diabetologia 1, 75 (1965) (Abstr.).

SCHLICHTKRULL, J.,
BRANGE, J.,
EGE, H.,
HALLUND, O.,
HEDING, L.G.,
JØRGENSEN, K.H.,
MARKUSSEN, J.,
STAHNKE, P.,
SUNDBY, F.,
VØLUND, Aa.:

Proinsulin and related proteins. Paper presented at the 5th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Montpellier, France, 1969.

SCHLICHTKRULL, J.,
BRANGE, J.,
CHRISTIANSEN, Aa.,H.,
HALLUND, O.,
HEDING, L.G.,
JØRGENSEN, K.H.:

Clinical aspects of insulin-antigenicity. Diabetes, 21, Suppl. 2, pg. 649 - 656, (1972)

SCHWARTSMAN, J.,
CRUSIUS, M.E.,
BEIRNE, D.P.:

Diabetes mellitus in infants under one year of age. Amer. J. Dis. Child 74, 587 (1947).

SCHWARTZ, J.,
KLETTER, J.,
KLOPSTOCK, A.:

Partial immunological unresponsiveness to virus antigens in guinea-pigs. Int. Arch. Allergy 25, 83 (1964).

SHELLAM, G.R.,
NOSSAL, G.J.V.

Mechanism of induction of immunologic tolerance. IV. The effects of ultra-low doses of flagellin. Immunology, 14, 273 (1968).

SHIPP, J.C.,
RUSSELL, R.O.,
STEINKE, J.,
MITCHELL, M.L.,
HADLEY, W.B.:

Insulin resistance with high levels of circulating insulin-like activity demonstrable in vitro and in vivo. Diabetes 10, 1 (1961).

SHIPP, J.C.,
CUNNINGHAM, R.W.,
RUSSELL, R.O.,
MARBLE, A.:
Insulin resistance: clinical features, natural course and effects of adrenal steroid treatment.
Medicine 44, 165 (1965).

SILVERMAN, J.L.:
Eosinophil infiltration in the pancreas of infants of diabetic mothers.
A clinicopathological study.
Diabetes 12, 528 (1963).

SKOM, J.H.,
TALMAGE, D.W.:
Non-precipitating insulin-antibodies.
J. Clin. Invest. 37, 783 (1958a).

SKOM, J.H.,
TALMAGE, D.W.:
The role of non-precipitating insulin-antibodies in diabetes.
J. Clin. Invest. 37, 787 (1958b).

STANSFIELD, O.H.,
WARREN, S.:
Inflammation involving the islands of Langerhans in diabetes; report on pathological findings.
New Engl. J. Med. 198, 686 - 687 (1928).

STARK, O.K.:
Studies on pneumococcal polysaccharide. II. Mechanism involved in production of "immunological paralysis" by type I pneumococcal polysaccharide.
J. Immunol. 74, 130 (1955).

STEIGERWALD, H.,
SPIELMANN, W.,
FRIES, H.,
GREBE, S.F.:
Neue Untersuchungen über die Antigenwirkung des Insulins.
Klin. Wschr. 38, 973 (1960).

STEINER, H.:
Insulitis beim perakuten Diabetes des Kindes.
Klin. Wschr. 48, 417 - 421 (1968).

STEINER, D.F.,
HALLUND, O.,
RUBENSTEIN, A.,
CHO, S.,
BAYLISS, C.:
Isolation and properties of proinsulin, intermediate forms, and other minor components from crystalline bovine insulin.
Diabetes 18, 725 - 736 (1968).

STEFFEN, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie sowie ihre klinische Anwendung. Thieme, Stuttgart, 1968.

STROHFELDT, P.: Insulinallergie und Insulinresistenz. In: H. Robbers: Praktische Diabetologie. S. 114, Werk-Verlag Dr. Banaschewski, München 1969.

THANNHÄUSER, S.J., FELD, H.: Insulinmangelkoma und insulinrefraktäres Koma im Verlauf eines Diabetes mellitus. Klin. Wschr. I, 252 - 258 (1933).

TORESON, W.E., FELDMAN, R., LEE, J.C., GRODSKY, G.M.: Pathology of diabetes mellitus produced in rabbits by means of immunization with beef insulin. (abstr.). Amer. J. Clin. Path. 42, 531 (1964).

TORESON, W.E., LEE, J.C., GRODSKY, G.M.: The histopathology of immune diabetes in the rabbit. Amer. J. Path. 52, 1099 - 1115 (1968).

TUCKER, W.R., KLINK, D., GOETZ, F., ZALME, E., KNOWLES, H.C. jr.: Insulin resistance and acanthosis nigricans. Diabetes 13, 395 (1964).

UHR, J.W., BAUMANN, J.B.: Antibody formation. I. Suppression of antibody formation by passively administered antibody. J. exp. Med. 113, 935 - 957 (1961).

VALLANCE-OWEN, J., DENNES, E., CAMPBELL, P.N.: The nature of the insulin antagonist associated with plasma albumin. Lancet II, 696 - 697 (1958).

VAN BEEK, G.: Amyloid deposits in island of Langerhans in diabetes mellitus. Ned. tschr. geneesk 83, 640 - 654 (1939).

WALDHAUSL, W., FRISCH, H., HAYDT, H.: Immunological aspects in diabetes. Insulin antibodies in diabetes: Incidence and treatment by monocomponent insulin. European Association for the Study of Diabetes, 8th Annual Meeting, Madrid 1972.

WARREN, S., ROOT, H.F.: The pathology of diabetes with special reference to pancreatic regeneration. Amer. J. Path. 1, 415 (1925).

WARREN, S.H.: The pathology of diabetes children. J. Am. Med. Ass. 88, 99- 101 (1927).

WARREN, S.H., LECOMPTE, P.M.: The pathology of diabetes mellitus. 3rd edit. Lea and Febiger, Philadelphia 1952.

WARREN, S.H., LE COMPTE, P.M., LEGG, M.A.: The pathology of diabetes mellitus. 4th edit. Lea and Febiger, Philadelphia 1966.

WASSERMAN, P., BROH-KAHN, R.H., MIRSKY, I.A.: The antigenetic property of insulin. J. immunol. 38, 213 (1940).

WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik. Gustav Fischer-Verlag, 6. Auflage, Jena 1967.

WEBER, G., KÖLSCH, E.: Low zone tolerance: a possible defect in the switch from IgM to IgG production. Eur. J. Immunol. 2, 191 - 193 (1972).

WEHNER, H., SCHADE, U., LIEBERMEISTER, E., VEIGEL, J.: Glomerular changes induced by immunization with heterologous insulin. Pathol. Inst. Univ. Tübingen - Virchows Arch. Abt. A. Path. Anat. 349/4 345 - 356 (1970).

WEIGLE, W.O.: The immune response of rabbits tolerant to bovine serum albumin to the injection of other heterologous serum albumines. J. exp. Med. 114, 111 (1961).

WEIGLE, W.O.: Termination of acquired immunological tolerance to protein antigens following immunization with altered protein antigens. J. exp. Med. 116, 913 (1962).

WEIGLE, W.O.: Recent observations and concepts in immunological unresponsiveness and autoimmunity. Clin. exp. Immunol. 9, 437 - 447 (1971).

WEISS, D.W.: Inhibition of tuberculin skin hypersensitivity in guinea pigs by injection of tuberculin and intact tubercle bacilli during foetal life. J. exp. Med. 108, 83 (1958).

WIDE, L., PORATH, J.: Radioimmunoassay of proteins with the use of sephadex-coupled antibodies. Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 130 257 - 260 (1966).

WIENER, H.J.: Diabetic coma requiring an unprecedented amount of insulin. Report of a case manifesting extreme insulin resistance. Amer. J. med. Sci. 196, 211 (1938).

WILSON, S., DIXON, G.H., WARDLAW, A.C.: Resynthesis of cod insulin from its polypeptide chains and the preparation of cod-ox "hybrid" insulins. Biochim. Biophys. Acta 62, 483 (1962).

WRIGHT, P.H.: Production on acute insulin deficiency by administration of insulin antiserum. Nature 183, 829 (1959).

WRIGHT, P.H.,
KRISBERG, R.A.,
HALPERN, B.,
DOLKART, R.E.:
Properties of insulin antibodies produced by the guinea-pig, horse, sheep, and man.
Diabetes 11, 519 (1962).

WRIGHT, P.H.,
MALAISSE, W.J.:
A simple method for the assay of guinea pig anti-insulin serum.
Diabetologia 2, 178 - 188
(1966).

YAGI, A.,
MAIER, P.,
PRESSMAN, D.,
ARBESMAN, C.E.,
REISMAN, R.E.,
LENZNER, A.R.:
Multiplicity of insulin binding antibodies in human sera.
J. Immunol. 90, 760 (1963).

YALOW, R.S.,
BERSON, S.A.:
Plasma insulin concentration in non-diabetic and early diabetic subjects.
Diabetes 9, 254 - 260 (1960).

YOUNG, F.G:
On insulin and its action.
Proc. Roy. Soc. (Londcn)
157 B, 1 - 25 (1962).

ZAHARKO, D.S.,
BECK, L.V.:
Studies of a simplified plasma insulin immunoassay using cellulose powder.
Diabetes 17, 444 - 457 (1968).